

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Zentrum der Inneren Medizin
Medizinische Klinik IV
Direktor: Prof. Dr. med. A. M. Zeiher

Ultraschall-induzierte Destruktion von Plasmid-DNA-beladenen Microbubble-Vektoren

Ein neues non-virales Vektorsystem
für den lokalen Gentransfer

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von Sergio Richter
aus Fulda

Frankfurt am Main 2004

Dekan:	Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. A.M. Zeiher
Koreferent:	Priv. -Doz. Dr. R.P. Brandes
Tag der mündlichen Prüfung:	Montag, 08. August 2005

***„We all have the knowledge of DNA,
but we still die“***

aus White Coats von New Model Army

Meinem Vater

Abstract

Background:

Progress in cardiovascular gene therapy has been hampered by concerns regarding the safety and practicality of viral vectors and the inefficiency of current nonviral transfection.

This approach had the purpose to determine whether ultrasound-targeted destruction of plasmid DNA-loaded albumin microbubbles (*UTMD*) is an efficient and safe nonviral transfection technique for local vascular gene delivery.

Methods and Results:

Perfluoropropane-filled microbubbles were produced by sonication of 5% human serum albumin in the presence of plasmid DNA encoding for β -galactosidase or the phosphomimetic active endothelial nitric oxide synthase (*eNOS S1177D*). In this way plasmid DNA can be easily incorporated directly into the albumin microbubble shell.

Application of diagnostic ultrasound (2.2MHz, 173fps, MI=1.2, USE=5s) to porcine coronary arteries perfused with plasmid DNA-loaded albumin microbubbles resulted in a marked vascular transgene expression without any functional impairment of vasoreactivity. Thus, plasmid DNA remains functional after the sonication procedure and ultrasound-targeted microbubble destruction.

Detection of β -galactosidase in LacZ-transfected arteries revealed a predominant staining of the endothelial cell layer. β -galactosidase activity was significantly (~12-fold) enhanced in coronary arteries transfected with ultrasound-targeted destruction of LacZ-loaded microbubbles compared to transfection with plasmid DNA-loaded microbubbles without ultrasound or ultrasound-induced transfection with plasmid DNA alone.

An increase in concentration of plasmid DNA-microbubbles correlated with an increase in *UTMD*-transfection efficiency, whereas an increase in flow velocity (2ml/min) enhanced transgene expression that however decreased using higher perfusion rates of 10ml/min.

Western blotting revealed transgene expression of *eNOS S1177D* in protein extracts from *UTMD*-transfected coronary arteries. Vascular responsiveness was tested using prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) and the NOS inhibitor N^o-monomethyl-L-arginine (*LNMA*). Compared to coronary artery segments treated with the expression plasmid alone, the $PGF_{2\alpha}$ -mediated precontraction was inhibited (~60%) in segments transfected with *eNOS S1177D* and the contractile response to the application of *LNMA* was markedly enhanced.

Conclusion:

The *UTMD*-technique enhances gene expression and transfection efficiency of naked plasmid DNA without any apparent toxicity in ultrasound-targeted transfection of coronary arteries in vitro and may represent an improved avenue for therapeutic vascular gene delivery in vivo.

Keywords:

Gene Transfer, Ultrasound, Microbubbles, Endothelium, Nitric Oxide Synthase

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Gentherapie	1
1.1.1.	Kardiovaskuläre Gentherapie	3
1.2.	Genvektoren	5
1.2.1.	Virale Genvektoren.....	7
1.2.2.	Non-virale Genvektoren.....	12
1.3.	Drug-targeting von Genvektoren	17
1.3.1.	Drug-targeting durch Ultraschall-induzierte Destruktion von Microbubble-Vektoren	19
1.4.	Bedeutung wichtiger Interaktionen von Ultraschall und Microbubbles.....	26
1.4.1.	Akustische Kavitation	26
1.4.2.	Verhalten von Microbubbles im Schallfeld.....	28
1.4.3.	Bedeutung des mechanischen Index	30
1.5.	Ziel der Dissertation	31
2.	Material und Methoden.....	33
2.1.	Herstellung der Microbubbles mittels elektromechanischer Sonifikation von Humanalbumin.....	33
2.1.1.	Herstellung Plasmid-DNA-beladener Microbubbles	33
2.1.2.	Nachweis der spezifischen DNA-Bindung an die Albuminschale der Microbubbles	34
2.2.	Präparation der Koronararterien.....	35
2.3.	Ex vivo-Transfektion von Koronararterien	35
2.3.1.	Plasmide.....	35
2.3.2.	Versuchsaufbau	35
2.3.3.	Versuchsprotokoll.....	35
2.4.	β -Galaktosidase-Aktivitätsmessung	37
2.5.	LacZ-Färbung.....	37
2.6.	Messung der Vasoreaktivität	38
2.7.	Nachweis der Endothelintegrität nach Ultraschallexposition	39
2.8.	Proteinanalyse	40
2.8.1.	Proteinisolation aus Koronararterien	40

2.8.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration	40
2.8.3.	Auftrennung von Proteinen durch SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese.....	40
2.8.4.	Western Blot.....	41
2.8.5.	Immundetektion von Western Blots.....	41
2.9.	Substanzen und Materialien.....	42
2.10.	Statistik	42
3.	Ergebnisse	43
3.1.	Herstellung von Microbubbles als Genvektoren	43
3.1.1.	Mikroskopische Analyse der Albumin-Microbubbles	43
3.1.2.	Nachweis der Echogenität und Zerstörbarkeit von Albumin- Microbubbles	43
3.1.3.	Nachweis der spezifischen Bindung von DNA an Microbubbles	44
3.2.	Gentransfektion durch ultraschall-induzierte Destruktion von LacZ-Plasmid-DNA- beladenen Microbubble-Vektoren (UIMD)	45
3.2.1.	Nachweis der Genexpression nach UIMD-Transfektion mit pcDNA-LacZ.....	45
3.2.2.	Effekt von Ultraschall und Microbubbles auf die Transfektion mit pcDNA-LacZ.....	47
3.2.3.	Einfluß der Plasmid-DNA-Konzentration und der Perfusionsrate auf die UIMD-Transfektion mit pcDNA-LacZ	48
3.2.4.	Messung der Endothelfunktion nach Gentransfektion mit der UIMD-Methode	51
3.3.	Gentransfektion durch ultraschall-induzierte Destruktion von eNOSmt-Plasmid-DNA-beladenen Microbubble- Vektoren.....	52
3.3.1.	Nachweis der Genexpression nach UIMD-Transfektion mit pcDNA-eNOSmt	53
3.3.2.	Effekt der UIMD-Transfektion mit pcDNA-eNOSmt auf die Vasoreaktivität.....	54
4.	Diskussion	57
4.1.	Herstellung von Albumin-Microbubbles.....	57
4.1.1.	Einfluß des Gases auf die Stabilität der Microbubbles	57
4.2.	Herstellung Plasmid-DNA-beladener Microbubble-Vektoren	60
4.2.1.	Bedeutung der spezifischen Bindung von DNA an Microbubbles	60
4.3.	Plasmid-DNA beladene Microbubbles als Genvektoren.....	62

4.3.1.	Ex vivo Transfektion von Koronararterien durch ultraschall- induzierte Destruktion von Plasmid-DNA-beladenen Microbubbles (UIMD).....	62
4.4.	Effekt der UIMD-Methode auf die Endothelintegrität	69
4.5.	eNOS-Gentransfer mit der UIMD-Methode	71
5.	Zusammenfassung	79
6.	Literaturverzeichnis	81
7.	Publikationen.....	93
8.	Danksagung	94
9.	Schriftliche Erklärung	96
10.	Lebenslauf.....	97

1. Einleitung

Seit über 10 Jahren stellt die somatische Gentherapie angeborener und erworbener genetischer Erkrankungen eine der innovativsten biomedizinischen Wissenschaftsbereiche dar. Die meisten hereditären und chronischen Krankheiten können trotz moderner Medizin oft nur symptomatisch behandelt werden.

Fortschritte in der Entschlüsselung des menschlichen Genoms und in der Molekularbiologie haben grundlegend das Verständnis der Zusammenhänge und Ursachen von Erkrankungen revolutioniert. Dabei scheinen Veränderungen von Genen und deren Regulation eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Kenntnis genetischer Veränderungen als Krankheitsursache eröffnet die Möglichkeit einer gentherapeutischen Behandlung oder Prävention von Erkrankungen. Die bisher etablierten konservativen Behandlungsstrategien könnten so in Zukunft durch eine entsprechende somatische Gentherapie unterstützt oder sogar ersetzt werden, mit der nicht nur eine symptomatische, sondern auch kausale Behandlung der Erkrankung möglich ist.

1.1. *Gentherapie*

Unter Gentherapie versteht man „das Einbringen genetischen Materials in die Zellen eines Individuums mit dem Ziel, therapeutischen oder prophylaktischen Nutzen für das Individuum zu erzielen“ (NIH 2001).

In der Gentherapie ist per definitionem die Nukleinsäure (meist DNA) das verabreichte Pharmakon, das die Zelle in einen körpereigenen Wirkstoff umwandelt. Diesem Konzept liegt die Erkenntnis zugrunde, daß in den Genen die Bausteine für Proteine verschlüsselt liegen. Das erfolgreich in die Zielzelle eingeschleuste therapeutische Gen führt zur Produktion des eigentlich wirksamen Agens. Mit Ausnahme der *anti-sense*-Methode kommt es nach Aufnahme der DNA in den Zellkern durch Transkription der therapeutischen DNA-Sequenz zur Bildung zahlreicher mRNA-Moleküle, die dann im Zytoplasma zu den therapeutischen Proteinen translatiert werden.

Den Grundstein für die Entwicklung der Gentherapie legten 1953 Watson und Crick mit der Erschließung der dreidimensionalen Struktur der DNA und den Mechanismen ihrer Replikation (Watson 1953). Diese bedeutende, mit dem Nobelpreis honorierte Entdeckung ebnete den Weg zum Verständnis der Genfunktion auf molekularem Niveau. Anfangs diente der Transfer genetischen Materials in eukaryote Zellen zur Untersuchung von Genfunktionen (Scangos 1981). Mit der Charakterisierung zahlreicher Gen- und Proteinfunktionen sowie

deren Störungen trat zunehmend das Interesse in den Vordergrund, genetische Defekte beim Menschen auf molekularem Niveau gezielt zu beheben. So wurde schon früh als Ziel die Korrektur monogener Erbkrankheiten formuliert (Fogarty 1971).

Die erste gentherapeutische Behandlung eines Menschen erfolgte 1990 an einer vierjährigen Patientin mit schwerem kombiniertem Immundefizienz-Syndrom (*ADA-SCID*). Dieser Erkrankung liegt ein autosomal rezessiv vererbter Mangel an Adenosin-Deaminase zugrunde, der zur Bildung immuninkompetenter T- und B-Lymphozyten führt. In periphere T-Lymphozyten der Patientin wurde ex vivo mit Hilfe eines retroviralen Vektors das Adenosin-Deaminase (*ADA*)-Gen eingebracht und die transduzierten Zellen der Patientin wieder infundiert (Blaese 1995, Bordignon 1995). Die Therapie wurde über 2 Jahre mit klinischem Erfolg durchgeführt, wobei das Transgen in 30% der zirkulierenden T-Zellen nachgewiesen werden konnte (Blaese 1995).

Heute werden klinische Gentherapiestudien nicht nur zur Behandlung von monogen vererbten Erkrankungen wie Hämophilie (F.VIII / IX), Mukoviszidose (CFTR), *ADA-SCID* (Adenosin-Deaminase) oder Duchenne-Muskeldystrophie (Dystrophin) durchgeführt, sondern auch zur Therapie von komplexeren Krankheiten wie vor allem maligne Tumoren und kardiovaskuläre Erkrankungen, deren Ursachen auch genetisch aber multifaktoriell bedingt sind. Aber auch die Entwicklung gentherapeutischer Ansätze zur Präventivmedizin wie Gen-Impfstoffe stehen im Blickpunkt des Interesses (Amara 2001). Mittlerweile werden mehr als 4000 Patienten in über 500 klinischen Studien gentherapeutisch behandelt (NIH 2002), und obwohl in den meisten Studien eine ausreichende therapeutische Zuverlässigkeit als gesichert gilt, konnten nur wenige signifikante Therapieerfolge erzielt werden (Ganten 1997).

Die vielversprechenden Entwicklungen in der humanen Gentherapie wurden 1999 durch den ersten offiziellen Todesfall des achtzehnjährigen Jesse Gelsinger im Rahmen einer adenoviralen Gentherapie (Marschall 1999) und durch die Aufdeckung bis dato nicht publizierter Gentherapie-assoziiierter Komplikationen überschattet (Davies 2000, Somia 2000). Der Vorfall war insofern tragisch, als daß der an Ornithin-Transcarbamylase-Mangel leidende Patient durch die konventionelle Substitutionstherapie seine Stoffwechselkrankheit unter Kontrolle hatte, was zu berechtigter Kritik in der Öffentlichkeit führte und Zweifel an der Glaubwürdigkeit gentherapeutischer Forschung aufkommen ließ.

Deshalb sollte vor dem Hintergrund einer zukünftigen klinischen Anwendung die Entwicklung sicherer und effizienter Genvektoren absolute Priorität haben. Dies

erfordert, daß die Grundlagen des jeweiligen Gentransfersystems bis in die molekularen Details aufgeklärt und die Sicherheit und Effizienz der Transgenexpression in unterschiedlichen Zielgeweben an Tiermodellen für humane Erkrankungen zuverlässig nachgewiesen werden (Leiden 2000, Orkin 2002).

1.1.1. Kardiovaskuläre Gentherapie

Die koronare Herzerkrankung (*KHK*) ist eine der häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität in den Industrieländern. Hohes Alter und fortgeschrittene Therapiestrategien führen in der Bevölkerung zu einer stetig zunehmenden Zahl an Patienten mit schwerer und komplexer koronarer Mehrgefäßerkrankung. Konservative Therapiestrategien zur Revaskularisierung sind deshalb nicht selten ausgereizt, so daß sich mit dem vaskulären Gentransfer in die Gefäßwand eine neue, vielversprechende Behandlungsalternative eröffnet (Nabel 1995, Gibbons 1996).

Mittlerweile wurden eine Reihe gentherapeutischer Strategien für die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen entwickelt, vor allem zur Restenose-Prävention nach Angioplastie und Stent-Implantation sowie zur Verbesserung der myokardialen und peripheren Durchblutung bei schwerer chronischer Ischämie (YlaHerttuala 2000). Restenose nach Angioplastie tritt abhängig vom behandelten Gefäß in etwa 30-40% der Fälle auf und stellt die Antwort auf den durch den Ballonkatheter / Stent induzierten Gefäßwandschaden dar. Das Korrelat der zunehmenden Gefäßobstruktion ist eine Neointima-Proliferation bestehend aus glatten Gefäßmuskelzellen und extrazellulärer Matrix (Bauters 1997, Indolfi 1998). In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, daß durch lokalen Transfer viraler Vektoren, welche für Gene kodieren, die auf Wachstum und Funktion von Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen modulierenden Einfluß nehmen, die neointimale Proliferation nach Angioplastie gehemmt werden kann (Baek 1998, DeYoung 1998). Aufgrund mangelnder Sicherheit viraler Vektoren gestaltet sich jedoch eine klinisch praktikable Anwendung viraler Gentransferstrategien schwierig (Marshall 1999), vor allem wenn es sich um eine primär nicht notwendige, gentherapeutische Alternative zur Behandlung der Restenose handelt. Daher besteht für den lokalen vaskulären Gentransfer ein besonderes Interesse in der Entwicklung non-viraler Gentransfermethoden, die den Ansprüchen an Sicherheit und zugleich hoher Effizienz gerecht werden.

Humane kardiovaskuläre Gentherapie-Studien laufen zur Zeit vor allem im Zuge der therapeutischen Angiogenese an ischämischem Myokard (Rosengart 1999, Vale 2000, NIH 2002) und ischämischem Skelettmuskel (Isner 1996, Baumgartner 1998, Kalka 2000, NIH 2002).

Auf der Pionierarbeit von Jeffrey Isner basiert die Hypothese, daß durch direkte intramuskuläre Injektion nackter Plasmid-DNA, die für vaskuläre Wachstumsfaktoren kodiert, das Transgen in der ischämischen Muskulatur exprimiert wird und somit eine Angiogenese induziert werden kann. Dieses Konzept konnte in präklinischen Studien gut belegt werden und ermöglichte so eine Reihe klinischer Studien mit Genvektoren für angiogene Wachstumsfaktoren wie den Isoformen des vascular endothelial growth factors (*VEGF*), fibroblast growth factor (*FGF-4*), platelet derived growth factor (*PDGF*) und hypoxia inducible factor (*HIF-1*) (NIH 2002). Dabei werden als Genvektoren vor allem rekombinante Adenoviren oder nackte Plasmid-DNA eingesetzt und entweder durch intravasale oder direkte muskuläre Injektion appliziert.

Die erste klinische Studie zur therapeutischen Angiogenese begann am 7. Dezember 1994 und wurde unter der Leitung von Jeffrey Isner an Patienten mit chronischer peripherer arterieller Verschußkrankheit durchgeführt. Dabei wurde den Patienten VEGF-Plasmid-DNA über einen Angioplastiekatheter in die ischämische Extremität appliziert (Isner 1996). Diese Patienten mit kritischer Ischämie waren mit Ausnahme der Extremitätenamputation mit den konventionellen Möglichkeiten austherapiert. Aufgrund dessen und der Tatsache, daß bei schwerer chronischer Ischämie VEGF-Rezeptoren mit hoher endothelialer Spezifität exprimiert sind, wurde das Einverständnis für den ersten kardiovaskulären Gentransfer mit VEGF-Plasmid-DNA an diesen Patienten gebilligt. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte daraufhin auch an Patienten mit chronisch ischämischer Herzinsuffizienz zeigen, daß die intramyokardiale Applikation von VEGF-Plasmid-DNA über einen speziellen Nadel-Injektionskatheter zu einer signifikanten Steigerung der Myokardperfusion und Verkleinerung der Ischämiezone führt (Vale 2001) und mit klinischer Besserung der Angina pectoris-Symptomatik einhergeht (Losordo 1998, Vale 2001).

In den folgenden Studien zur therapeutischen Angiogenese am Myokard wurden zunehmend adenovirale Vektoren eingesetzt, zunächst an Patienten mit schwerer chronischer KHK, bei denen die konventionellen kardiologischen und chirurgischen Therapiemöglichkeiten ausgeschöpft waren (Rosengart 1999). Mittlerweile werden in einer von vier laufenden Phase III-Studien zum myokardialen Gentransfer in den USA rekombinante adenovirale Vektoren, die für FGF-4 kodieren (*Ad5.1FGF-4*), an Patienten mit chronisch stabiler Angina pectoris intrakoronar injiziert (NIH-452 2001).

Beim vaskulären Gentransfer steht vor allem mit dem Endothel eine hervorragende Zielstruktur zur genetischen Modifikation der Gefäßwand zur Verfügung. Aufgrund des histo-anatomischen Aufbaus der Gefäßwand mit den drei

Schichten Endothel, Media und Adventitia ist theoretisch ein gezielter Gentransfer aller drei Gefäßwandschichten möglich, zumal diese durch elastische Membranen voneinander getrennt sind und somit Barrieren für Genvektoren darstellen (Rome 1994).

Das Endothel als gentherapeutisches *target* bietet jedoch den Vorteil, daß es eine sehr große Oberfläche besitzt und in direktem Kontakt mit dem strömenden Blut steht. Somit ist die Zielstruktur durch intraluminale Vektorapplikation einfach zu erreichen, was einen relativ spezifischen endothelialen Gentransfer ermöglicht, zumal die innere elastische Membran für viele Vektorsysteme eine nicht überwindbare Barriere darstellt. Die in vivo Transfektion der Endothelzellschicht eröffnet neue therapeutische Strategien zur Modifikation pathologischer Gefäßwandprozesse, die durch endotheliale Dysfunktion, Plaque-Bildung und Thrombose charakterisiert sind. Deshalb sind unter den zahlreichen therapeutischen Genen vor allem NO-Synthasen ausgezeichnete Kandidaten für den endothelialen Gentransfer, zumal deren Substrat Stickstoffmonoxyd wichtige pleiotrope und antiatherogene Effekte auf die Gefäßwand besitzt (s. Abb. 1.1.). Die Abnahme der Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxyd in der Gefäßwand spielt eine bedeutende Rolle im pathophysiologischen Prozeß der endothelialen Dysfunktion und ist frühzeitig an der Pathogenese der Atherosklerose involviert (Cohen 1995), siehe Kapitel 4.5.

- Regulation von Perfusion und Blutdruck
- Antiatherogene Effekte
 - anti-aggregatorisch:* Hemmung der Plättchenaggregation/ -adhäsion
 - anti-inflammatorisch:* Hemmung der Adhäsion neutrophiler Granulozyten/ Monozyten
 - anti-proliferativ:* Inhibition der VSMC-Proliferation und Synthese extrazellulärer Matrix
 - anti-oxidativ:* Hemmung der Oxidation von Lipiden/ LDL
- Inhibition von Endothelzellapoptose

Abb. 1.1.: Effekte von Stickstoffmonoxyd auf das Gefäßsystem

1.2. Genvektoren

An einen idealen Genvektor für eine humane vaskuläre Gentherapie wird eine Reihe an Forderungen gestellt, die grundlegend sind, um einen sicheren und zugleich effektiven lokalen Gentransfer zu ermöglichen (Somia 2000).

Zunächst sollte die Produktion des Vektors einfach sein, standardisiert und sicher reproduzierbar. Ausreichend hohe Titer sind nicht nur bei der Produktion, sondern auch am Zielorgan notwendig, was eine gewisse Produktstabilität des Vektors voraussetzt. Durch gezieltes *targeting* kann eine zielzellspezifische Expression erreicht werden, dabei sollte die Integrität des Genvektors durch den Vektortransfer nicht beeinträchtigt sein und die Expression des therapeutischen Gens zumindest für die erwünschte Dauer aufrechterhalten und bedarfsgerecht reguliert werden. Optimal wäre ein Vektor, bei dem die Insertkapazität für das therapeutische Gen und den notwendigen regulatorischen Genelementen nicht größenlimitiert ist, ein Problem, das sich vor allem bei den viralen Vektorsystemen aufgrund limitierter maximaler Aufnahmekapazitäten stellt.

Neben der geforderten hohen Effizienz und Zellspezifität sollte der entsprechende Vektor keine Toxizität aufweisen, weder direkt durch den Vektor vermittelt noch über eine durch den Vektor induzierte Immunreaktion gegen transduzierte Zellen. Zudem sollte keine vorbestehende Immunität gegen den Vektor oder einer seiner Bestandteile bestehen, um immunogen bedingte Entzündungsreaktionen zu vermeiden. Um eine effektive therapeutische Wirkung zu erzielen, wäre eine genügend lang andauernde rekombinante Genexpression (stabile Expression) wünschenswert, und zwar nicht nur in sich teilenden Zellen, sondern auch in Zellen, die sich in der Ruhe-Phase befinden, da bekannt ist, daß die basale Mitoserate in der Gefäßwand sowohl gesunder als auch atheromatös veränderter Koronararterien nur $< 1\%$ beträgt (Gordon 1990, O'Brien 1993). Obwohl in der Entwicklung von Gentransfersystemen in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt wurden, konnte bisher keiner der entwickelten und in der vaskulären Gentherapie eingesetzten Vektoren diesen Ansprüchen gerecht werden. Werden jedoch in Abhängigkeit vom Therapieziel gewisse Kompromisse eingegangen, stehen vielversprechende Vektorsysteme in Aussicht.

Unter einem Vektor versteht man ein genetisches Element, das als „Vehikel“ für fremde DNA, sogenannte Passagier-DNA, genetische Information überträgt. Für den vaskulären Gentransfer stehen unterschiedliche Vektoren zur Verfügung, wobei generell zwischen viralen und non-viralen Vektoren unterschieden wird (Mountain 2000). Erfolgt der Gentransfer mit non-viralen Systemen, spricht man von Transfektion, werden Viren als Vektoren zur Übertragung genetischer Information auf andere Zellen eingesetzt, von Transduktion. Ein non-viraler Vektor enthält als grundlegendes Element in der Regel komplementäre Plasmid-DNA, in die das therapeutische Gen integriert ist und die durch andere

Elemente verpackt wird. Bei viralen Vektoren ist das Gen in das virale Genom integriert, wobei das Virus selbst als Vektor fungiert (Friedmann 1997).

Ein ideales zellspezifisches Vektorsystem besteht aus den Komponenten therapeutische DNA, dem Vektor selbst und einer rezeptorbindenden Einheit, dem sogenannten targeting-Modul, über das die Affinität zu den Zielzellen erhöht wird. Mit der Passagier-DNA wird nicht nur eine Transkriptionsvorlage zur Synthese rekombinanter Proteine bereitgestellt, sondern sie kann auch als Hybridisierungspartner mit antisense-Orientierung zu bestimmten RNA-Molekülen dienen, um die Proteinbiosynthese pathologischer Moleküle zu verhindern. Der Vektor selbst fungiert als Träger der therapeutischen DNA und schützt diese vor Degradation durch plasmatische Endonukleasen und vor frühzeitiger hepatischer Elimination. Das targeting-Modul ist für eine höhere Zellspezifität des Vektorsystems verantwortlich und soll eine selektive Transfektion und somit einen gezielten Gentransfer ermöglichen. Mit Hilfe solcher targeting-Module können die Transfereffizienz und die Sicherheit des Vektors in der Gentherapie verbessert werden (s. Kap. 1.3.).

1.2.1. Virale Genvektoren

In der Entwicklung von Vektoren zur Gentherapie wurden zunächst Viren verwendet, die im Laufe der Evolution effiziente Mechanismen zur Überwindung extra- und intrazellulärer Barrieren entwickelt haben.

Wildtyp-Viren benutzen nach erfolgreichem Transfer ihres Genoms in die Zelle die fremden wirtszelleigenen Mechanismen zur Vermehrung. Um beim Einsatz viraler Vektoren die Virusreplikation im Wirtsorganismus zu verhindern, werden die dafür nötigen viralen Wildtyp-Gene herausgeschnitten und durch das therapeutische Gen ersetzt. Dies macht aber bei der Herstellung infektiöser Viruspartikel sogenannte Helferzell-Linien erforderlich, über die fehlende Replikationsproteine exprimiert werden. Dadurch können in den Helferzellen komplette, aber replikationsdefekte Viruspartikel mit der Fähigkeit zur einmaligen Infektion hergestellt werden (Kay 2001).

Die drei am häufigsten verwendeten viralen Vektorsysteme für den (vaskulären) Gentransfer basieren auf Adenoviren, dem adeno-assoziierten Virus und den Retroviren (Kay 2001).

1.2.1.1. Adenoviren

Im Tiermodell konnte vielfach die hohe Effizienz viraler Vektoren gezeigt werden, wobei sich besonders adenovirale Transfersysteme aufgrund von hoch erreichbaren Virustitern und eines breiten Spektrums an möglichen Zielzellen für

den Gentransfer eignen (Kovesdi 1997). Die Anwendung von Adenoviren in der humanen Gentherapie ist aber aufgrund folgender Probleme limitiert: hohe Prävalenz immunisierter Patienten, vektor-induzierte Immunantwort auf virus-transduzierte Zellen und direkte zytotoxische Wirkung durch das Virus.

In der Bevölkerung besteht eine hohe Prävalenz an Immunität gegenüber Adenoviren, da einige der insgesamt mehr als 41 Serotypen als Erreger von respiratorischen, intestinalen und okulären Infektionen weit verbreitet und daher für eine hohe Durchseuchung verantwortlich sind (Flomenberg 1995, Schulick 1997), was einen erfolgreichen Gentransfer mit adenoviralen Vektoren ohne gleichzeitige Immunsuppression erschwert. Dieser Aspekt bleibt bei vielen erfolgreich durchgeführten tierexperimentellen Modellen unberücksichtigt, da die meisten Versuchstiere für humanpathogene Adenoviren seronegativ sind. Der hohe Durchseuchungsgrad der Bevölkerung birgt zudem die Gefahr, daß beim Einsatz rekombinanter Adenoviren diese mit den Wildtypadenoviren rekombinieren und so neue pathogene Wildtypviren entstehen können.

Durch die gute Infizierbarkeit sowohl ruhender als auch proliferierender Gewebe kann es zu einer unerwünschten Genexpression in Normalgewebe kommen, vor allem in der Leber (Kovesdi 1997). Bei der Behandlung von Tumoren konnte beobachtet werden, daß nach i.v.-Applikation von Adenoviren die normale Leber stärker transduziert wurde als der Tumor selbst (Brand 1997). Zudem kann es bei hohen Virustitern aufgrund des Lebertropismus und der eliminationsbedingten Akkumulation in der Leber zu einer überschießenden Genexpression in Hepatozyten kommen, die mit stark hepatotoxischer Wirkung und fatalen Folgen einhergehen kann. So wurde 1999 nach adenoviraler Gentherapie eines Patienten mit Ornithintranscarbamylase-Mangel der erste Todesfall beschrieben, der mit einer akuten fulminanten Hepatitis assoziiert war (Marshall 1999).

Häufig führt ein primär erfolgreicher vaskulärer Gentransfer mit adenoviralen Vektoren zu nur kurz dauernder rekombinanter Genexpression, da transduzierte Zellen virale Proteinbestandteile über MHC-I Proteine darbieten und somit eine Immunreaktion gegen virustransduzierte Zellen induziert wird, was nicht nur die rekombinante Genexpression beeinträchtigt, sondern auch zum Zelltod führen kann. Neben der immunogen bedingten Schädigung kann es speziell bei der Transduktion von Endothelzellen mit Adenoviren zu einer starken inflammatorischen Aktivierung der Endothelschicht kommen (Newman 1995), die möglicherweise positiven Effekten der vaskulären Gentherapie entgegenwirkt, zumal die Infiltration inflammatorischer Zellen und die Endothelzellaktivierung eine wichtige pathogenetische Rolle in der Entwicklung und Pro-

gression atherosklerotischer Veränderungen spielen und mit Plaqueruptur assoziiert sind (Mann 1996). Ein weiteres limitierendes Element bei der Anwendung adenoviraler Vektoren sind direkt toxische Effekte auf die Gefäßwand, vor allem wenn hohe virale Titer verwendet werden. Beschrieben wurde neben einem Absterben von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen auch ein Ablösen der Endothelzellschicht. Diese schweren toxischen Effekte können aber durch niedrigere Virustiter weitgehend vermieden werden (Schulick 1995).

Um die virus-assoziierte Immunantwort und Entzündungsreaktion zu minimieren, wurden neben der Entwicklung innovativer Methoden zur Immunsuppression neuere Generationen an rekombinanten Adenoviren konstruiert, bei denen die Expression viraler Proteine vermindert („replication-defective adenovirus“) oder vollständig aufgehoben ist (Engelhardt 1994, Kochanek 1996). Letztere werden auch als „backbone vectors“ bezeichnet, bei denen alle für Virusproteine kodierenden Sequenzen herausgeschnitten sind. Dadurch steigt die Insert-Kapazität für die Passagier-DNA von ~8kBp auf bis zu 30kBp, was den Transfer größerer oder auch mehrerer Gene ermöglicht (Somia 2000).

1.2.1.2. Adeno-assoziierte Viren

Mit den sogenannten adeno-assoziierten Viren stehen vielversprechende virale Vektoren zur Verfügung (Flotte 1995, Monahan 2000). Ähnlich den adenoviralen Vektoren können mit adeno-assoziierten Viren verschiedene Zelltypen unabhängig von einer aktiven Zellproliferation transduziert werden. Es handelt sich um replikationsdefekte, nicht humanpathogene Parvoviren, die im Vergleich zu Adenoviren weniger immunogen sind und keine virus-assoziierte Infiltration inflammatorischer Zellen in der Gefäßwand hervorrufen, was in einer stabileren und längeren Genexpression resultiert (Flotte 1995, Lynch 1997). Da adeno-assoziierte Viren in das Empfänger-genom integrieren können, kann auch deshalb mit einer Langzeitexpression gerechnet werden (Kaplitt 1994, Flotte 1995). Der Einsatz von adeno-assoziierten Viren in der vaskulären Gentherapie gestaltet sich jedoch schwierig, da die Insert-Kapazität für das entsprechende Gen nur etwa 4.8kBp beträgt und aufgrund einer erschwerten Bereitstellung von Helfer-Zelllinien zur Amplifizierung des Vektors nur geringe Virustiter zur Verfügung stehen. Durch neu entwickelte Methoden zur Virusgewinnung (Zolotukhin 1999) konnten erste vielversprechende gentherapeutische Ansätze erzielt werden (Mohuczy 1999).

1.2.1.3. *Retroviren*

Retroviren finden in der vaskulären Gentherapie als Vektoren weniger Beachtung, da sie mit Ausnahme der Lentiviren die intakte Kernmembran nicht passieren und deshalb nur Zellen infizieren können, die sich zum Zeitpunkt der Infektion in einer aktiven Phase der Replikation befinden (Miller 1990). Zudem können replikationskompetente infektiöse Viruspartikel repliziert und theoretisch maligne Transformationen induziert werden (Donahue 1992). Retrovirale Vektoren können auch nur bis zu 8kBp fremde DNA-Sequenzen transferieren (Eglitis 1998). Der Vorteil von Retroviren liegt in einer Langzeitexpression durch Integration der Virus-DNA in das Empfänger-genom. Unter den retroviralen Vektoren können die Lentiviren (Klimatcheva 1999) auch ruhende Zellen infizieren und bieten somit Potential für einen effizienteren vaskulären Gentransfer.

Im Gegensatz dazu ist in der Tumorthherapie mit retroviralen Vektoren neben der Langzeitexpression die Eigenschaft einer fehlenden Transduzierbarkeit ruhender Zellen aber von Vorteil, da sie eine Art Schutzfunktion für das den Tumor umgebende Normalgewebe bietet.

1.2.1.4. *Andere Viren*

Von den übrigen Viren, die sich in der Entwicklung als Vektoren für den Gentransfer befinden, sei noch das Herpes simplex-Virus genannt, das sich von den anderen viralen Vektoren aufgrund der größeren Insert-Kapazität von ~50kBp und seines Neurotropismus unterscheidet. Zudem können mit Herpes-Viren auch sich nicht teilende Zellen infiziert werden. Nachteilig ist die geringe Gentransfereffizienz und eine stärkere Zytotoxizität mit geringer Langzeitexpression. Wie beim Einsatz von adenoviralen Vektoren können neue pathogene rekombinante Wildtypviren entstehen (Caruso 1996).

Virale Vektoren besitzen ein großes Potential für den Einsatz in der Gentherapie, dessen Etablierung sich jedoch mit einigen limitierenden Faktoren konfrontiert sieht. So ist die maximal einsetzbare Größe des therapeutischen Gens durch die Kapazität des jeweiligen Viruskapsids limitiert. Weiterhin kann die Applikation hoher Virustiter zu toxischen und immunogenen Reaktionen im Zielorganismus führen, was eine wiederholte therapeutische Applikation problematisch gestaltet (Booster-Effekt). Die Herstellung replikationsdefizienter viraler Vektoren ist aufwendig und schwierig, mitunter ineffizient und kann mit unvorhersehbaren Folgen bei der in vivo Anwendung einhergehen. Retrovirale und adeno-assoziierte Vektoren können direkt in das Wirtszellgenom integrieren mit dem Vorteil der Langzeitexpression, jedoch birgt dies das Risiko einer

Insertionsmutagenese, in Folge derer zelluläre Onkogene aktiviert oder Tumorsuppressorgene inaktiviert werden können.

Obwohl derzeit virale Vektorsysteme die höchste in vivo Transfereffizienz aufweisen, steigt aufgrund oben genannter Nachteile und Risiken verstärkt das Interesse an der Entwicklung effizienter non-viraler Gentransfersysteme.

Vektor	Insertkapazität	Integration ins Wirtsgenom	Pro	Contra
Adenoviren	~ 30 kBp	–	<ul style="list-style-type: none"> sehr effiziente Transduktion teilender/ nicht teilender Zellen Hepatotropismus hohe Titer produzierbar relativ große Insertkapazität 	<ul style="list-style-type: none"> starke Immunantwort geringe Zellspezifität transiente Expression
AAV	≤ 5 kBp	+	<ul style="list-style-type: none"> stabile Transduktion teilender/ nicht teilender Zellen niedrige Immunogenität non-pathogen 	<ul style="list-style-type: none"> geringe Insertkapazität keine Helferzelllinie benötigt replizierende Adenoviren => niedrige Titer
Retroviren	≤ 8 kBp	+	<ul style="list-style-type: none"> Integration der DNA in Empfänger genom => long-term gene expression geringere Immunogenität 	<ul style="list-style-type: none"> sehr geringe Transduktionseffizienz in sich nicht replizierenden Zellen erhöhtes Risiko der insertionellen Mutagenese limitierter Insert
HSV	≤ 50 kBp	–	<ul style="list-style-type: none"> große Insertkapazität Neurotropismus Transduktion teilender/ nicht teilender Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> starke Zytotoxizität geringe Transduktionseffizienz

AAV = adeno-assoziiertes Virus, HSV = Herpes-simplex Virus, kBp = Kilobasenpaare

Tab. 1.1.: Vergleich viraler Vektoren

1.2.2. *Non-virale Genvektoren*

Als Vektoren für den non-viralen Gentransfer werden vor allem Plasmid-DNA und Oligonukleotide alleine oder gekoppelt als DNA-Liposomenkomplexe bzw. Protein-DNA-Komplexe eingesetzt (s. Tab. 1.2.).

Gemeinsame Vorteile dieser Vektoren sind die im Gegensatz zu viralen Gentransfersystemen wesentlich geringere vaskuläre und systemische Toxizität sowie Immunogenität, was mit einer höheren therapeutischen Sicherheit einhergeht. Außerdem besteht die Möglichkeit, größere DNA-Sequenzen transfizieren zu können, da beim Einsatz viraler Vektoren die Insert-Kapazität für die Passagier-DNA ein limitierender Faktor in der Übertragung größerer Gene darstellt. Bei Retro- und Adenoviren liegt das Limit bei ~8 kBp, beim Adeno-assoziierten Virus (AAV) mit ~5 kBp sogar noch niedriger. Diesen Vorteilen steht eine oft nur unzureichende Transfektionseffizienz gegenüber (Felgner 1997), wobei vor allem die Überwindung der zellmembranen Barriere ein Problem darstellt, da non-virale Vektoren im Gegensatz zu den viralen nicht die Fähigkeit besitzen, über Bindung an bestimmte Oberflächenrezeptoren das genetische Material in die Zellen einzuschleusen.

Als einfachsten non-viralen Genvektor kann ein nacktes Plasmid-DNA-Konstrukt angesehen werden, jedoch ist die Gentransfereffizienz nach einfacher Injektion nackter Plasmid-DNA in der Regel gering (Felgner 1997). So können zur Optimierung der oft nur geringen Transfektions- weniger der Transduktionsraten die Vektoren an bestimmte Reagenzien gekoppelt werden, die nicht nur das Einschleusen des Vektors in die entsprechenden Zellen erleichtern, sondern auch einen frühzeitigen Abbau des genetischen Materials durch DNAsen verhindern. Zudem wird mit der Anwendung chemischer und physikalischer Methoden versucht, die zellulären Membranen temporär durch Permeabilitätserhöhung für einen Transfer durchlässiger zu machen.

1.2.2.1. *Synthetische Viren*

Aufgrund der hohen Transfereffizienz viraler Vektoren wird bei der Entwicklung non-viraler Gentransfersysteme versucht, grundlegende Mechanismen von viralen Vektoren zur Überwindung extra- und intrazellulärer Barrieren zu imitieren. Non-virale Genvektoren wie Lipoplexe oder Polyplexe, die auf diesem Prinzip basieren, werden deshalb auch als synthetische Viren bezeichnet.

1.2.2.1.1. *Lipofektion*

Liposomen sind künstlich hergestellte kugelförmige Vesikel, die aus ein oder mehreren konzentrischen Lipiddoppelschichten mit wässrigem Innenraum

bestehen. Zur Reduktion der Oberflächenspannung schließen sich die Lipide zu sphärischen Gebilden niedrigerer Energie, den Liposomen zusammen (Felgner 1987).

Eine häufig angewandte Methode ist die sogenannte Lipid-vermittelte Transfektion (Lipofektion), bei der Liposomen / DNA-Komplexe (Lipoplexe) als Gentransfervektoren eingesetzt werden. Kationische Liposomen aggregieren aufgrund der elektrostatischen Interaktion mit negativ geladener DNA spontan zu sogenannten Lipoplexen (Gershon 1993). Die Liposomen bestehen in der Regel aus einer kationischen Lipid-Trimethylammoniumverbindung (DOTMA) und einem neutralen Helferlipid wie Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) oder Cholesterin, das den Komplex mit der DNA stabilisiert und den Transfer in das Zytoplasma erleichtert (Hui 1996). Da die DNA in der Regel mit einem Überschuß an positiv geladenen Lipiden komplexiert wird, können die Lipoplexe durch elektrostatische Wechselwirkung an negativ geladene Proteoglykane der Zellmembran binden und dann aktiv über Endozytose in die Zellen aufgenommen werden (Zabner 1995, Hui 1996, Li 2000).

Die intrazelluläre Freisetzung der DNA aus den Endosomen stellt ein komplexes Geschehen dar. Durch den intraendosomal niedrigen pH-Wert wird der Lipoplex destabilisiert, außerdem führen Interaktionen von negativ geladenen Lipiden der Endosomenmembran mit den DNA-Komplexen zur Destabilisierung sowohl der Lipoplexe selbst als auch der Endosomenmembran. Durch Zugabe von Helferlipiden (Hui 1996) oder Einsatz von pH-sensitiven Lipiden (Legendre 1992) kann dieser Freisetzungsprozeß begünstigt werden.

In einer Reihe von in vivo Versuchen konnte gezeigt werden, daß die systemische Anwendung von kationischen Lipid / DNA-Komplexen zu einem erfolgreichen Gentransfer in die Gefäßwand führt (Hofland 1997, Liu 1997, Mahato 1998, Rolland 1998). Durch Kopplung der kationischen Lipid / DNA-Komplexe an Substanzen, die an bestimmte Rezeptoren der Zellmembran binden, kann die transmembrane Aufnahme des genetischen Materials durch rezeptorvermittelte Endozytose weiter verbessert werden. Es konnte gezeigt werden, daß die Transfektion von humanen Endothelzellen mit Plasmid-DNA-Liposomenkomplexen, die auf ihrer Oberfläche Apolipoprotein E tragen, zu einer signifikant höheren Transfektionseffizienz führt (Siphehia 1995).

Durch eine kombinierte Anwendung von Lipid / DNA-Komplexen und Ultraschall (s. Kap. 1.2.2.3.2.) kann die Effizienz der Gentransfektion gesteigert werden (Unger 1997, Lawrie 1999, Koch 2000). So konnte im Tumormodell an Mäusen nach systemischer Gabe von Plasmid-DNA-Liposomen-Komplexen und lokaler

Beschallung des Primärtumors dieser erfolgreich mit Anti-Tumorgenen transfiziert werden (Anwer 2000). Ultraschall erleichtert nicht nur die Aufnahme von Lipid / DNA-Komplexen in die Zellen, sondern beschleunigt auch die membran-destabilisierende hexagonale Phase der transmembranen Passage von DOPE, was die endosomale DNA-Freisetzung begünstigt und so weniger DNA in den Endosomen enzymatisch abgebaut wird (Tata 1992, Farhood 1995, Gao 1995).

1.2.2.1.2. Polyfektion

Die Transfektion mit Polymer / DNA-Komplexen wird als Polyfektion bezeichnet. Kompaktierung von Nukleinsäure ist ein natürlicher Prozeß, der nicht nur bei Viren, sondern auch in eukaryontischen Zellen durch positiv geladene Proteine (Polykationen) erreicht wird. Um das mögliche Risiko einer Immunantwort zu vermeiden, werden für die Vektorkonstruktion statt natürlicher Proteine wie Protamin oder Histone synthetisch hergestellte Polykationen verwendet. Die am häufigsten verwendeten Polymere sind Poly-L-Lysin und Polyethylenimin (PEI). Die DNA-Kompaktierung erfolgt ebenfalls durch elektrostatische Wechselwirkung mit dem kationischen Polymer, dabei entstehen virusgroße Partikel (Polyplexe), die als Genvektoren eingesetzt werden. Die Kompaktierung zu Polyplexen schützt die DNA vor Abbau durch Nukleasen und ermöglicht die Aufnahme in die Zelle durch Endozytose (Wagner 1991). Voraussetzung dafür ist eine positive Nettoladung der Polymer / DNA-Komplexe, die auch erheblichen Einfluß auf die Gentransfereffizienz hat. Die Ladungsverhältnisse können indirekt über den Stickstoff / Phosphat-Quotienten angegeben werden.

Ähnlich den Lipoplexen ermöglicht die überschüssige positive Ladung die Interaktion des Genvektors mit den negativen Ladungen der Proteoglykane auf der Zelloberfläche und führt über Endozytose zur Internalisierung des genetischen Materials (Kircheis 2000, Li 2000). PEI ist ein lineares kationisches Polymer (22kDa), das aufgrund seiner chemischen Struktur nicht nur DNA-kompaktierende Eigenschaften besitzt, sondern auch einen endosomolytischen Effekt hat: Tertiäre Aminogruppen begünstigen die Freisetzung von Genvektoren aus den Endosomen. Polyethylenimin, das bei physiologischem pH nur partiell protoniert ist, besitzt die Fähigkeit, bei saurem pH Protonen aufzunehmen. Um den niedrigen pH in den Endosomen aufrechtzuerhalten, muß die endosomale Protonenpumpe viel mehr Protonen in das Lumen pumpen, was zu einem osmotischen Ungleichgewicht führt. Aufgrund des gleichzeitigen Einstroms von Cl^- -Ionen kommt es zu einer starken osmotischen Schwellung und letztendlich

zur Destabilisierung der Endosomen mit Freisetzung der DNA (Boussif 1995, Kichler 2001).

Nicht nur Zellkulturen konnten in vitro erfolgreich mit der Anwendung von Polyplexen transfiziert werden (Lambert 1996, Ferrari 1997), sondern auch in einer Reihe von in vivo Experimenten an Mäusen konnte gezeigt werden, daß mit der Polyfektion ein effizienter Gentransfer möglich ist (Ferrari 1997, Kircheis 1999, Zou 2000). So konnten nach systemischer Applikation linearer PEI / DNA-Komplexe Epithelzellen der Lunge erfolgreich transfiziert werden (Ferrari 1997).

1.2.2.2. Chemische Methoden

Die ersten Experimente zur Gentransfektion an Säugetierzellen stammen aus den 60iger Jahren und wurden mit chemischen Methoden durchgeführt. Dabei verwendeten Vaheri und Pagano 1965 erstmals Diethylaminoethyl (DEAE)-Dextran, etwas später konnten Graham et al. mit der Kalziumphosphat-Technik Zellen erfolgreich transfizieren (Graham 1973). Beide Substanzen komplexieren die polyanionische DNA und bilden Präzipitate. Diese werden an der Zelloberfläche adsorbiert und durch Endo- bzw. Phagozytose in die Zelle aufgenommen. Je nach Zelllinie liegt die Transfektionseffizienz zwischen 10% und 30% (Graham 1973, Colosimo 2000). Obwohl lokale Anwendungen in vivo beschrieben sind, eignet sich die Methode kaum für den in vivo Gentransfer aufgrund der ausgeprägten Zytotoxizität von Kalziumphosphat- und DEAE-Dextran-Präzipitaten (Wu 1998a).

1.2.2.3. Physikalischen Methoden

Mit physikalischen Methoden wie die Anwendung von Schockwellen oder Ultraschall (Sonoporation), Anlegen eines elektrischen Feldes (Elektroporation) oder durch osmotische Behandlung (osmotischer Schock) kann eine kurzfristige Permeabilitätserhöhung durch Bildung reversibler Membranporen induziert und der Gentransfer in die Zelle erleichtert werden. Dies ermöglicht auch die Aufnahme von Substanzen, die unter physiologischen Bedingungen aufgrund ihres Molekulargewichts die Zellmembran nicht passieren können.

1.2.2.3.1. Elektroporation

Die elektrisch induzierte Öffnung reversibler Membranporen wird als Elektroporation bezeichnet (Chang 1990). Es konnte mehrfach gezeigt werden, daß mit dieser Methode erfolgreich Zellen mit nackter DNA transfiziert werden können (Neumann 1982, Gallo 1997). In vitro kann mit Elektroporation eine transiente Genexpression mit Transfektionsraten von bis zu 90% erreicht werden

(Ledley 1995), aber auch über stabile Langzeitexpression an hämatologischen Vorläuferzellen wird berichtet (Matthews 1995). Auch die Anwendung von Elektroporation in vivo führt zu erfolgreicher Genexpression (Somari 2000). So konnte nach intramuskulärer Applikation von nackter DNA durch Anlegen eines pulsierenden elektrischen Feldes eine signifikante Steigerung der Expressionsrate erzielt werden (Bettan 2000, Vicat 2000).

1.2.2.3.2. Sonoporation

Unter den physikalischen Methoden zur Verstärkung non-viraler Transfektion gewinnt die Anwendung von Ultraschall zunehmend an Bedeutung. Mit dem Ultraschall steht eine etablierte diagnostische Methode zur Verfügung, die sich exzellent für einen lokalen vaskulären Gentransfer in vivo mit der Möglichkeit begleitender Bildgebung eignet. Ultraschall induziert die Aktivierung von Gas-einschlüssen in flüssigen Medien, was zur Bildung reversibler Poren in der Zellmembran führen kann (Miller 1996, AIUM 2000). Dabei ermöglicht die kurzzeitige Permeabilitätssteigerung gefolgt von einem sofortigen Wiederschließen der Poren den Transfer von DNA, Peptiden oder anderen Makromolekülen in die Zelle. Dieses Phänomen wird als Sonoporation bezeichnet (s. Kap. 1.4.1.).

Schon seit längerem ist bekannt, daß Zellen in vitro mit Hilfe von Ultraschall transfiziert werden können (Fechenheimer 1987). Weitere Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß durch ultraschall-unterstützte Transfektion mit Plasmid-DNA in vitro (Kim 1996, Bao 1997, Wyber 1997, Greenleaf 1998, Lawrie 1999) und in vivo an Tumoren (Miller 1999, Huber 2000) der Gentransfer effektiv gesteigert werden kann. Die genauen Mechanismen der ultraschall-unterstützten Transfektion sind im Detail nicht geklärt, jedoch wird postuliert, daß akustische Kavitation und Sonoporation die Hauptmechanismen darstellen (Kim 1996, Bao 1997) (s. Kap. 1.4.1.).

Änderung der Membranpermeabilität durch Sonoporation wird auch bei der Anwendung von Schockwellen beobachtet (Miller 1998). So können mit Hilfe der Schockwellen-Lithotripsie Zellen erfolgreich mit nackter DNA transfiziert werden (Delius 1995, Lauer 1997, Bao 1998). Dabei scheinen Kavitationseffekte eine wichtige Rolle zu spielen, zumal bekannt ist, daß bei der klinischen Anwendung der Schockwellen-Lithotripsie Kavitation für die Fragmentierung von Gallen- und Nierensteinen verantwortlich ist.

Vektor	Pro	Contra
Plasmid-DNA	<ul style="list-style-type: none"> ■ einfache Methodik ■ große Mengen produzierbar ■ geringe Immunogenität im Vergleich zu viralen Vektoren ■ hoher Sicherheitslevel 	<ul style="list-style-type: none"> ■ sehr geringe Transfektions-effizienz
Lipid / DNA-Komplexe	<ul style="list-style-type: none"> ■ größere DNA-Insertkapazität ■ breites Spektrum an zu transfizierenden Zielzellen ■ nicht toxisch ■ nur gering immunogen 	<ul style="list-style-type: none"> ■ geringe Transfektionseffizienz ■ geringe Zellspezifität
DNA / Protein-Komplexe	<ul style="list-style-type: none"> ■ zellspezifisch ■ Transfer größerer DNA-Moleküle möglich 	<ul style="list-style-type: none"> ■ ineffizienter Gentransfer in vivo ■ immunogen

Tab. 1.2.: Vergleich non-viraler Vektoren

1.3. Drug-targeting von Genvektoren

Um systemische unerwünschte Nebeneffekte weitgehend zu minimieren und einen effektiven lokalen Gentransfer zu ermöglichen, sollte ein Gentransfersystem entwickelt werden, das möglichst zell- oder gewebespezifisch ist und zu einer lokalen Genexpression vor allem im Zielorgan führt. Unter diesem Prinzip wird das *drug-targeting* verstanden und stellt eine wichtige Voraussetzung für die klinische Umsetzbarkeit gentherapeutischer Strategien dar. Ein weiterer wichtiger Aspekt des drug-targeting besteht in der Möglichkeit, im Zielgewebe ausreichend hohe Vektorkonzentrationen zu erreichen, da eine zu niedrige Vektordosis im Zielgewebe nur zu einer ineffektiven Genexpression führt, ein scheinbar einfaches, aber schwer zu bewältigendes Problem (Luo 2000).

Ein zielgerichteter Gentransfer kann optimiert werden, indem man entweder zell-spezifische Promotoren (transkriptionelles targeting) verwendet oder Vektoren mit einem definierten Zelltropismus konstruiert (rezeptorvermitteltes targeting).

In der Gentherapie werden besonders potente virale Promotoren (CMV-/ SV40-Promotoren) verwendet, die relativ gewebeunspezifisch zu einer starken Genexpression führen (konstitutive Promotoren) (Rhodes 1999). Im Gegensatz dazu stehen für den vaskulären Gentransfer spezifische Promotoren zur Verfügung, die eine gezielte endotheliale Genexpression ermöglichen. Beispiele für endothelspezifische Promotoren sind Promotoren von Thrombomodulin (Weiler-

Guettler 1996), vWF (Aird 1995), ICAM-2 (Cowan 1998), tie-2 (Sato 1993) und KDR (Patterson 1997). Eine weitere Möglichkeit, auf die Transgenexpression regulatorischen Einfluß zu nehmen, bieten sogenannte induzierbare Promotoren, die unter bestimmten endogenen Stimuli wie Hypoxie (Dachs 1997) oder Inflammation angeschaltet (induziert) werden. Bekannte zytokin-induzierbare endothelspezifische Promotoren sind der VCAM-1- (Iademarco 1992) und P-Selektin- (Pan 1993) Promotor.

Bindung und Aufnahme des Vektors in die Zelle kann durch den Einbau einer spezifisch Rezeptorbindenden Einheit in den Genvektor (targeting Modul) deutlich verbessert werden (s. oben). Einfaches Beispiel solch eines Rezeptorspezifischen Genvektors ist die chemische Kopplung eines Rezeptorliganden oder Antikörpers an Polykationen wie Polyethylenimin, was erstmals 1987 von Wu et al. beschrieben wurde.

Sind zellspezifische Oberflächenrezeptoren eines Zielorgans bekannt, kann durch Modifizierung von Kapsidproteinen viraler Vektoren, die selektiv an diese Rezeptoren binden, ein gezielter Gentransfer erreicht werden (Kasahara 1994). Auch die Zellspezifität für non-virale Vektoren kann durch Rezeptor-vermittelten Gentransfer verbessert werden, indem DNA-komplexierte Reagenzien mit dem natürlichen Liganden oder einem gegen den entsprechenden Rezeptor gerichteten Antikörper gekoppelt werden (Kircheis 1997). Über Rezeptor-vermittelte Endozytose wird so das genetische Material in die Zielzellen aufgenommen. Der Nutzen dieses Konzepts konnte in einer Vielzahl von Experimenten unter Verwendung unterschiedlichster Rezeptorliganden deutlich gemacht werden, darunter Transferrin (Wagner 1991, Kircheis 1999), Lipoproteine (Siphehia 1995) und diverse Wachstumsfaktoren. Auch synthetische Peptide, die den natürlichen Liganden imitieren (z.B. Integrin-bindende RGD-Peptide), können erfolgreich als Rezeptorliganden eingesetzt werden (Harbottle 1998).

Für die in vivo Anwendung kann zudem mit ausgewählten Applikationsverfahren die systemische Disseminierung des genetischen Materials durch lokale Anwendung weiter minimiert und so das drug-targeting effizient unterstützt werden.

Intraoperativ oder im Rahmen einer Transplantation kann durch direkte Injektion der Vektor gezielt in ein Organ eingebracht werden. Vor allem am Herzen konnte intraoperativ durch myokardiale Injektion sowohl von Plasmid-DNA als auch adenoviralen Vektoren eine erfolgreiche Genexpression nachgewiesen werden (Donahue 1997, Schumacher 1998).

Ideal beim vaskulären Gentransfer scheinen Katheter-basierte Verfahren zu sein. Nicht nur aufgrund der topographischen Nähe zur Gefäßwand und des direkten Kontaktes zum Endothel, sondern auch durch die getrennte Gefäßversorgung einzelner Organbezirke kann so ein lokalisierter Gentransfer erreicht werden. Dafür stehen weiterentwickelte Kathetersysteme zur Verfügung. So kann im Falle einer lokalen endothelialen Läsion mit einem Doppelballon-Katheter ein Arteriensegment isoliert und der Vektor gezielt infundiert werden (Nabel 1990), ohne daß es zu einer systemischen Streuung des Vektors kommt. Um einen ischämischen Schaden durch das Kathetersystem zu verhindern, wurden Perfusionskatheter entwickelt, bei denen während der Vektorapplikation die Organperfusion erhalten bleibt (Tahlil 1997). Weitere Möglichkeiten zur katheter-basierten Genapplikation eröffnen sich im Rahmen der Angioplastie und Stentimplantation. So kann mit einem Angioplastie-Katheter der Vektor über einen Hydrogel-beschichteten oder Nadelinjektions-Ballon in die Gefäßwand eingebracht werden (Riessen 1993). Auch die Implantation beschichteter Stents stellt eine wichtige Option für einen lokalen vaskulären Gentransfer dar. Biopolymere wie Fibrin eignen sich dabei nicht nur zur protektiven Beschichtung der Stents, sondern auch um genetisch modifizierte Endothelzellen (Flugelman 1992) oder Vektoren in die Gefäßwand einzubringen (McKennan 1998).

1.3.1. Drug-targeting durch Ultraschall-induzierte Destruktion von Microbubble-Vektoren

Microbubbles sind kleine gashaltige Mikrosphären aus hitzebehandeltem Humanalbumin, die in der Klinik als Ultraschallkontrastmittel etabliert sind und ein breites Spektrum in der klinischen Anwendung besitzen. In jüngster Zeit eröffnen sich mit den Microbubbles neben der Anwendung in der Ultraschall-diagnostik aber auch neue potentielle therapeutische Möglichkeiten.

1.3.1.1. Microbubbles als Ultraschallkontrastmittel

Im Schallfeld erzeugen gasgefüllte Microbubbles aufgrund der großen akustischen Impedanz an der Grenzfläche zu Flüssigkeiten oder Gewebe eine starke Reflektion der Schallwellen (s. 1.4.2.). So wird im Rahmen einer diagnostischen Ultraschalluntersuchung durch intravasale Applikation von Ultraschallkontrastmitteln das Signal von strömendem Blut verstärkt, was zur Perfusionsdetektion von Gefäßen, Shuntverbindungen und vaskularisiertem Gewebe genutzt wird. Zielgerichtete Ultraschallkontrastmittel (s. 1.3.1.2.) werden seit kurzer Zeit nicht nur diagnostisch zur Charakterisierung von Zellen und Gewebe eingesetzt,

sondern können auch therapeutisch angewandt werden. Zum Beispiel kann mit Hilfe von zielgerichteten (*site-targeted*) Microbubbles der Effekt einer Sonothrombolyse verstärkt werden (Tachibana 1995). Dabei werden die Microbubbles mit spezifischen Liganden gekoppelt, die an aktivierte Plättchen eines Thrombus binden, der so unter Ultraschallexposition nicht nur dargestellt, sondern auch aufgrund der durch die Interaktion von Ultraschallwellen mit den Microbubbles induzierten Kavitationseffekte lysiert werden kann (Wu 1998b). Zudem können mit zielgerichtetem Kontrastultraschall therapeutische Läsionen erzeugt werden (kardiale Sonotherapie), beispielsweise im Rahmen einer myokardialen Septumablation bei hypertrophischer obstruktiver Kardiomyopathie, zur Herzklappendekalzifizierung oder Ablation akzessorischer Bahnen. Inwieweit Microbubbles bei der kardialen Sonotherapie in Zukunft eine Rolle spielen werden, bleibt abzuwarten.

1.3.1.2. Zielgerichtete Microbubbles

Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten, Microbubbles mit einem definierten Tropismus zu konstruieren (s. Abb. 1.2.). Generell können Microbubbles aufgrund der chemischen und elektrostatischen Eigenschaften ihrer Schale in der Mikrozirkulation an der Gefäßwand adhären, vor allem wenn es im Rahmen einer Entzündung zur Zellaktivierung kommt und bestimmte Rezeptoren upreguliert sind, die unspezifisch Albumin oder Lipidkomponenten der Microbubble-Schale binden können (Lindner 1998, 2000a). Ähnlich wie Liposomen und Polymere können Microbubbles mit spezifischen targeting Modulen (Biokonjugate) gekoppelt werden (s. 1.2.). Dabei werden spezifische Liganden oder Antikörper in die Microbubble-Schale integriert, so daß die Microbubbles an das entsprechende Zell- oder Oberflächenantigen binden. Zur besseren Erkennung können sogenannte „Spacer“ wie Polyethylenglykol (PEG) dazwischengeschaltet werden, die den spezifischen Marker aus der Bubbleschale herausragen lassen, wodurch die Affinität des Liganden erhöht wird (Klibanov 1999). Obwohl es eine Reihe unterschiedlicher Moleküle gibt, die als targeting Module eingesetzt werden können, sind monoklonale Antikörper und Oligopeptide aufgrund ihrer hohen Bindungsaffinitäten bevorzugte Partner für das targeting von Microbubbles (s. Abb. 1.2.).

Die Akkumulation von zielgerichteten Microbubbles am Ort des Interesses ermöglicht eine nicht-invasive Darstellung molekularer und zellulärer Prozesse. Gegenstand intensiver Forschung ist dabei die Erkennung und Bildgebung von Entzündungsprozessen, Thromben und Tumoren durch ligandenvermittelten Kontrastultraschall. Von besonderem Interesse für die kardiovaskuläre Anwen-

dung ist die Möglichkeit, Entzündungsprozesse und akute thrombotische Läsionen zu detektieren. Bei einem inflammatorischen Prozeß kommt es zur Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen. Als Antwort auf proinflammatorische Zytokine exprimieren Endothelzellen die Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin, es kommt zur Leukozytenadhäsion mit Aktivierung von Endothelzellen und Leukozyten. Letztere exprimieren auf ihrer Zelloberfläche Integrine, die mit den endothelialen Adhäsionsmolekülen VCAM-1 und ICAM-1 interagieren.

Die Bindung von zielgerichteten Microbubbles an aktivierte Leukozyten oder Endothelzellen bietet eine hervorragende Möglichkeit der nicht-invasiven Darstellung inflammatorischer Prozesse. Es konnte gezeigt werden, daß die beobachtete Akkumulation von Ultraschallkontrastmitteln in entzündlichem Gewebe vor allem auf der Bindung an aktivierte Leukozyten beruht (Lindner 2000 a, b). Dabei binden $\beta 2$ -Integrine auf aktivierten Leukozyten die Albuminmoleküle der Microbubble-Schale (Davis 1992, Lindner 2000a). Lipidformulierungen von Microbubbles können den Adhäsionsprozeß verstärken (Comis 1986). Diese ermöglichen eine Opsonierung der Microbubbles und es kommt über Komplementaktivierung zur Bindung an Komplementrezeptoren aktivierter Leukozyten (Lindner 2000a).

Bei Inflammation exprimieren aktivierte Endothelzellen in hohen Konzentrationen Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche, die unter physiologischen Bedingungen kaum nachweisbar sind. An atherosklerotischen Läsionen könnte mit der Identifikation dieser Oberflächenmoleküle eine Aussage über die Endothelfunktion und Plaquevulnerabilität getroffen werden. Die Arbeitsgruppe von Villanueva konnte zeigen, daß durch Kopplung mit monoklonalen Antikörpern gegen ICAM-1 die Microbubbles spezifisch an aktivierte koronare Endothelzellen binden, die dann nicht-invasiv mit Ultraschall detektiert werden können (Villanueva 1998). Dieses Prinzip konnte auch in vivo nach intravenöser Applikation von Lipid-Microbubbles, an die über einen Spacer Antikörper gegen P-Selektin gekoppelt wurden, erfolgreich angewandt werden (Lindner 2001). Dabei wurde flußzytometrisch gezeigt, daß über 30.000 Antikörper an ein Microbubble (2-4 μm) konjugiert werden können.

Wie schon erwähnt, wird die Kontrastsonographie auch zur Darstellung und Therapie von Thromben eingesetzt. Microbubbles können mit Oligopeptiden konjugiert werden, die an die aktive Bindungsdomäne des GPIIb/IIIa-Rezeptors auf aktivierten Thrombozyten spezifisch binden (Unger 1998). So werden Thromben unter Ultraschallexposition gezielt dargestellt, zumal dieser Rezeptor bei Plättchenaktivierung in hohem Maße exprimiert wird (Lefkovits 1995). Durch Erhöhung der Ultraschallenergie kann dann eine Zerstörung des Thrombus mit

oder ohne adjuvanter Lysetherapie erzielt werden (Tachibana 1995). Zudem könnte mit gegen den GPIIb/IIIa-Rezeptor gerichteten Microbubbles die Plättchenaktivierung zusätzlich inhibiert werden.

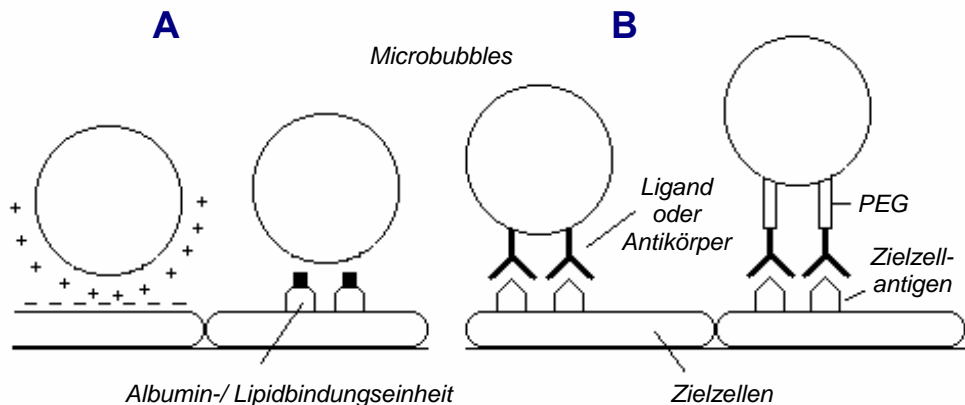


Abb. 1.2.: Strategien zum Targeting von Microbubbles

- A.** Aufgrund elektrostatischer Eigenschaften oder bestimmter Bestandteile der Albuminschale kommt es zu einer Interaktion der Microbubbles mit der negativ geladenen Zellmembran oder mit den bei Inflammation verstärkt exprimierten Oberflächenrezeptoren.
- B.** Durch Kopplung von spezifischen Antikörpern oder Liganden \pm Spacer (PEG) an die Albuminschale können die Microbubbles an zielzell-spezifische Rezeptoren oder Antigene binden.

1.3.1.3. Microbubbles als Genvektoren

In der Entwicklung von Transfervehikeln für therapeutische Substanzen sind neuerdings akustisch aktive Microbubble-Carrier von zunehmend wichtiger Bedeutung, da die Möglichkeit besteht, Microbubbles nicht nur mit targeting Liganden, sondern auch mit Medikamenten oder DNA zu beladen, die dann spezifisch im Zielorgan durch Ultraschallexposition lokal freigesetzt werden können.

In einem Schallfeld erzeugen Microbubbles bei bestimmter Schallenergie akustische Kavitation (s. 1.4.1.), die nicht nur zur *ultraschall-induzierten Destruktion* der Microbubble-Carrier (UIMD) mit lokaler Freisetzung der therapeutischen Substanz führt, sondern auch ballistische Effekte erzeugt, aufgrund derer die freigesetzte Substanz oder die Microbubble-Carrier selbst in oder durch die Gefäßwand geschleust werden können. Dieses Prinzip stellt ein ganz neues Potential für den Einsatz von Microbubbles als Genvektoren dar (Newman 2001, Unger 2001).

Das Konzept, Microbubbles als Vehikel für den lokalen Gentransfer einzusetzen, setzt eine Verpackung des genetischen Materials an oder in die akustisch aktiven Microbubbles voraus. Lokale Freisetzung der DNA in einem spezifischen Organ bzw. am Ort des Interesses kann dann durch ultraschall-induzierte Destruktion dieser beladenen Microbubble-Carrier erreicht werden. Diese Gentransfer-Strategie hat folgende Vorteile:

1. Die Beladung / Integration des genetischen Materials in die Microbubbles schützt die DNA vor Inaktivierung. Dies scheint besonders wichtig beim in vivo Gentransfer, wo plasmatische Endonukleasen und frühzeitige hepatische Clearance die intravaskuläre Stabilität für nackte DNA und Plasmid-DNA negativ beeinflussen. Zudem erlaubt die Integration der DNA in die Microbubble-Carrier durch den direkten Kontakt der DNA mit dem Kavitationskeim eine enge Kolokalisation der Nukleinsäure mit den für den Gentransfer verantwortlichen akustischen Bioeffekten. Die Freisetzung des genetischen Materials erfolgt also in direktem Zusammenhang mit der Aktivierung der Microbubbles.
2. Die fokale Destruktion der Microbubble-Carrier mit hochenergetischem Ultraschall ermöglicht eine gezielte DNA-Freisetzung und vermindert die systemische Konzentration an DNA, was mit einem besseren therapeutischen Index und Minimierung von Nebenwirkungen einhergeht.
3. Die UIMD-Transfektionsmethode ermöglicht und erleichtert einen transvaskulären (nicht-invasiven) Gentransfer.
4. Mit zielgerichteten Microbubbles gegen spezifische Oberflächenrezeptoren oder -antigene des Zielorgans kann lokal die Konzentration des Genvektors erhöht werden, was in Kombination mit UIMD ein gezieltes drug-targeting erheblich verbessert.
5. Der Gentransfer kann über sonographisches Monitoring kontrolliert durchgeführt werden, da der Genvektor selbst als Kontrastmittel fungiert.

Wie unter 1.2.2.3.2. beschrieben, kann Ultraschall die Permeabilität an Zellmembranen erhöhen und einen Gentransfer sowohl in vitro als auch in vivo erleichtern (Newman 2001). Gentransfer durch Sonoporation profitiert von der Anwesenheit akustisch aktiver Microbubbles, die die Kavitationsperformance von Ultraschall erhöhen (Bao 1997, Greenleaf 1998, Unger 2001). So konnte an Zellkulturen gezeigt werden, daß bei ultraschall-unterstützter Transfektion mit Plasmid-DNA die Zugabe von akustisch aktiven Microbubbles zu einer signifikanten Erhöhung der Genexpression führt im Vergleich zur Ultraschallbehandlung alleine (Bao 1997, Greenleaf 1998, Frenkel 2002).

Ultraschallkontrastmittel (i. e. Microbubbles) stellen präexistierende Kavitationskeime im Zielgewebe bereit und setzen somit die Schwellenenergie herab, bei der akustische Kavitation auftritt (Apfel 1991). In einem Schallfeld beginnen akustisch aktive Microbubbles zu oszillieren und können in Abhängigkeit von der Schallintensität kollabieren und zerstört werden, wodurch lokale Mikroströmungen, Schockwellen und Flüssigkeitsjets hoher Geschwindigkeiten auf angrenzende Flüssigkeiten und Zellstrukturen erzeugt werden (s. Kap. 1.4.1.). Diese ballistischen Bioeffekte könnten für die Erhöhung der Membranpermeabilität mitverantwortlich sein und so den transmembranen Gentransfer erleichtern. Obwohl noch andere potentielle Mechanismen existieren, die durch Oszillieren und Kollabieren der Microbubbles die Gentransfektion fördern, konnte in vitro an Zellkulturen nachgewiesen werden, daß bei der Transfektion mit Plasmid-DNA durch UIMD kurzfristige Porenbildung in der Zellmembran einer der Hauptmechanismen darstellt (Bao 1997). Diese Hypothese stützt die elektronenmikroskopische Beobachtung von kleinen transienten Membranporen ($\varnothing < 5 \mu\text{m}$) während der Ultraschallexposition (Tachibana 1999, Taniyama 2002 b), die den schnellen Uptake sowohl der therapeutischen DNA als auch der Microbubble-Carrier selbst erklären könnten.

Die ersten in vivo Experimente zum Gentransfer mit der UIMD-Transfektionsmethode konnten erfolgreich an Ratten durchgeführt werden. Shohet et al. konnten zeigen, daß UIMD von Albumin-Microbubbles, die mit Adenoviren inkubiert wurden, zu einer erfolgreichen myokardialen Transfektion führt. Dabei wurde ein adenoviraler Vektor, in den ein für β -Gal kodierendes Reportergen integriert wurde, mit einer Microbubble-Suspension inkubiert und intravenös verabreicht. Myokardiale Genexpression von β -Galaktosidase zeigte sich im ultraschall-exponierten Bereich nach UIMD-Transfektion, während keine Genexpression in Abwesenheit von Microbubbles oder UIMD nachweisbar war (Shohet 2000). Ähnliche Ergebnisse konnten an Ratten mit katheter-basierten Verfahren erzielt werden. Dabei wurde ein perkutan eingebrachter Ballonkatheter in der Aorta ascendens platziert, über den nach kurzfristiger Ballonokklusion und Gabe von Acetylcholin zur Verlängerung der Diastolendauer mit erhöhter Koronarperfusion adenovirale Microbubble-Vektoren appliziert wurden (Beerli 2002).

Im Hinblick auf die Problematik viraler Gentransfersysteme (s. Kap. 1.2.1.) wird zunehmend die Aufmerksamkeit auf den non-viralen Gentransfer mit Microbubbles und nackter Plasmid-DNA fokussiert (Chen 2001, Christiansen 2001, Vannan 2002, Taniyama 2002 a, b). Nach UIMD-Transfektion von Myokard (Chen 2001, Vannan 2002) oder Skelettmuskel (Christiansen 2001, Taniyama

2002 b) mit Microbubbles, die mit Reporter-Plasmiden inkubiert wurden, konnte eine im Vergleich zu den Kontrollexperimenten signifikant höhere Genexpression nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich keine wesentliche Transgenexpression außerhalb der beschallten Organe (Chen 2001, Christiansen 2001).

In kürzlich durchgeführten Untersuchungen konnte mehrfach gezeigt werden, daß die Transfektion mit nackter Plasmid-DNA und der UIMD-Methode eine vielversprechende therapeutische Option für die vaskuläre Gentherapie darstellt. Die Arbeitsgruppe von Taniyama konnte zeigen, daß mit dieser Methode die Transfektionseffizienz von nackter Plasmid-DNA sowohl in vitro als auch in vivo signifikant gesteigert werden kann (Taniyama 2002 a, b). Dabei wurde zur Herstellung der Microbubble-Genvektoren das kommerziell erhältliche Ultraschallkontrastmittel Optison® mit nackter Plasmid-DNA inkubiert. Zunächst konnten in vitro durch UIMD humane Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen sowie humane Skelettmuskelzellen erfolgreich mit Reporter-Plasmiden transfiziert werden. An einem in vivo Restenose-Modell an Karotisarterien von Ratten führte nach Ballondilatation die UIMD-Transfektion mit dem anti-onkogenen p53-Plasmid zu einer gesteigerten Genexpression und signifikanter Abnahme der Intima / Media-Ratio im Vergleich zur Kontrollgruppe (Taniyama 2002 a). In einer weiteren Arbeit konnte an einem Ischämie-Modell an Hasen diese Methode erfolgreich zur Stimulation der Angiogenese angewandt werden. Nach UIMD-Transfektion mit nackter HGF-Plasmid-DNA kam es zu einem signifikanten Anstieg der Kapillardichte und verbesserter Muskelperfusion im Vergleich zur Transfektion ohne Optison® (Taniyama 2002 b).

Der exakte Mechanismus der Transfektion von Plasmid-DNA durch ultraschallinduzierte Destruktion von Microbubble-Genvektoren bleibt jedoch noch ungeklärt. Wahrscheinlich spielen bei der transvaskulären in vivo Transfektion neben der Sonoporation weitere Mechanismen eine wichtige Rolle. So konnte durch intravitale Mikroskopie gezeigt werden, daß bei Zerstörung intravasaler Microbubbles durch Ultraschall kleinste Arteriolen und Kapillaren mit einem Durchmesser $\leq 7 \mu\text{m}$ rupturieren (Skyba 1998), was erfolgreich für den Transfer von kolloidalen Partikeln in das Interstitium des Zielorgans genutzt werden konnte (Price 1998, Mukherjee 2000).

Für einen vaskulären Gentransfer ist aber die Integrität des Endothels von entscheidender Wichtigkeit für eine erfolgreiche endotheliale Transfektion. Dies stellt hohe Anforderungen an die UIMD-Transfektionsmethode, zumal die Schwelle von der transienten zur letalen Sonoporation von vielen Faktoren abhängig ist, die in vivo nicht immer komplett überschaubar sind. So spielen neben Gewebeeigenschaften, den physikalischen Parametern des Ultraschalls

und den chemischen Eigenschaften der Microbubbles deren Größe und Konzentration eine wichtige Rolle.

1.4. Bedeutung wichtiger Interaktionen von Ultraschall und Microbubbles

1.4.1. Akustische Kavitation

Einer der wichtigsten Bioeffekte von Ultraschall stellt die akustische Kavitation dar. Akustische Kavitation beschreibt die Interaktion zwischen einem Ultraschallfeld und gashaltigen Einschlüssen (Microbubbles) in einem flüssigen Medium und ist definiert als schall-induzierte Aktivität von gashaltigen Hohlräumen (Miller 1996, AIUM 2000).

Man unterscheidet zwei Formen akustischer Kavitation, stabile (nicht-inerte) und transiente (inerte) Kavitation. Stabile Kavitation entsteht bei niedrigen Schallenergien durch Induktion von gleichmäßigen, niedrig-amplitudigen resonanten Oszillationen präexistierender Microbubbles, die zu akustischer Mikroströmung führen und lokale radiale Scherkräfte auf das enthaltende Gas und das angrenzende Medium erzeugen.

Erhöht man die Ultraschallenergie, steigt die Amplitude der Oszillationen, die Microbubbles werden instabil und kollabieren extrem schnell auf ein Bruchteil der Ausgangsgröße. Dabei kommt es zum Einstrom von Flüssigkeit, wobei die Trägheit der einströmenden Flüssigkeit die Bewegung der Bubbles maßgeblich beeinflusst (Flynn 1964). Diese Eigenschaft prägte deshalb den Begriff der inerten Kavitation. Durch die Geschwindigkeitsänderungen resultieren extrem hohen Drücke und Temperaturen im kollabierenden Bubble, die ausreichen können, um aufgrund der schlagartigen Kondensation von Wasserdampf freie Radikale (O_2^- , OH^-) zu bilden, welche reaktive oxygene Spezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) erzeugen können (Riesz 1992). Zudem entstehen während des Kollabierens erhebliche Schallabstrahlungen, die unter anderem Schockwellen und damit assoziierte Scherkräfte auf das angrenzende Medium erzeugen können. Geschieht dies in der Nähe von Grenzflächen, vor allem Zellmembranen und angrenzende Microbubbles, kommt es zu Flüssigkeitsjets hoher Geschwindigkeiten in diese Strukturen hinein (Miller 1996). Erreichen die Microbubbles nach Kollabieren ihr Minimalvolumen, kommt es zum Rebound, also einer Expansion der Bubbles und somit zu einem in die umgebende Flüssigkeit abgegebenen Druckpuls. Dann zerplatzen die Microbubbles sofort oder nach vier bis fünf weiteren Rebounds. Gaitan et al. konnten zeigen, daß unter speziellen Bedingungen sphärische Microbubbles nach symmetrischem Kolla-

bieren noch fortbestehen und während der einzelnen Schwingungsperioden weitere repetitive Expansions-Kontraktions-Zyklen durchlaufen, in denen niedrig-amplitudige Rebounds vorkommen (Gaitan 1990). Kollabieren die Bubbles jedoch asymmetrisch, zerfallen sie sofort und lösen sich auf, wobei Flüssigkeitsjets hoher Geschwindigkeiten entstehen.

Diese bei Aktivierung von Gaseinschlüssen auftretenden ballistischen Effekte auf angrenzende Zellen können reversible Membranschäden induzieren. Dabei kommt es zu einer temporären Bildung von Membranporen mit kurzzeitiger Erhöhung der Membranpermeabilität, was einen transmembranen Transfer von Makromolekülen in die Zelle ermöglicht. Dieses Phänomen wird als (subletale) Sonoporation bezeichnet. Kommt es dabei zu stärkerer Schädigung der Membran, sind die Zellen nicht mehr in der Lage, die Lecks zu reparieren und eine Zellyse tritt ein (letale Sonoporation). Die verantwortlichen Mechanismen dieser Bioeffekte sind im Detail nicht geklärt, es wird aber angenommen, daß beide Effekte unterschiedliche Grade ein- und derselben Mechanismen darstellen. Inerte Kavitation mit asymmetrischen Oszillationen und Microbubble-Kollaps scheint jedoch von entscheidender Bedeutung zu sein (Bao 1997).

Da in den meisten flüssigkeitshaltigen Geweben Gas in gelöster Form vorliegt, existieren potentielle Kavitationskeime, die durch Ultraschall aktiviert werden und so Adhäsions- und Kohäsionskräfte auf das Medium ausüben können. Zur Induktion von inerter Kavitation im Gewebe werden aber in der Regel höhere Schallenergien benötigt als solche, die bei der Anwendung von diagnostischem Ultraschall in der Klinik eingesetzt werden. Durch Zugabe von Microbubbles werden Kavitationskerne (-keime) für die inerte Kavitation in Form von stabilisierten Gassphäreneinschlüssen bereitgestellt, wodurch die Schwelle für das Auftreten von akustischer Kavitation auf etwa $1/3$ der dazu benötigten Schallenergie herabgesetzt wird (Atchley 1988). Spielt also die inerte Kavitation eine wichtige Rolle bei der ultraschall-unterstützten Transfektion durch Sonoporation, können durch die Zugabe von Microbubbles die akustischen Bioeffekte verstärkt und somit der Gentransfer in die Zellen erleichtert werden.

Ob Microbubbles im Ultraschallfeld mit stabiler oder instabiler Kavitation reagieren, hängt von vielen Faktoren ab. Druckamplitude im Schallfeld, Schallfrequenz, initiale Größe der Bubbles sowie physikalische Eigenschaften des flüssigen Mediums spielen dabei eine wesentliche Rolle. Die Kavitationsphänomene sind jedoch sehr komplexer Natur. Da normalerweise viele Microbubbles unterschiedlicher Größe vorhanden sind und das Ultraschallfeld inhomogen ist, treten stabile und instabile Kavitation simultan auf.

1.4.2. Verhalten von Microbubbles im Schallfeld

Die Reflexion von Schallwellen, die auf gashaltige Microbubbles in einem flüssigen Medium treffen, erklärt sich durch den großen akustischen Impedanzunterschied ΔZ von Luft zu Wasser:

$$Z_{\text{Luft}} = 0,0043 \cdot 10^6 \text{ kg/m}^2 \cdot \text{s}$$

$$Z_{\text{Wasser}} = 1,4890 \cdot 10^6 \text{ kg/m}^2 \cdot \text{s}$$

Diese hohe Impedanzdifferenz bewirkt praktisch eine Totalreflexion der Ultraschallwellen an der Grenzfläche Luft-Wasser, wodurch die reflektierte, am Empfänger registrierte Schalleistung sehr groß wird. Der geringe, nicht reflektierte Anteil der Schallenergie wird in Wärme umgesetzt (Nyborg 1991).

Ist die Amplitude des auf Microbubbles treffenden Schalldrucks niedrig, kommt es zu symmetrischen Oszillationen der Bubbles, die einer linearen Gleichung folgen. Verhält sich zeitlich der Schalldruck im flüssigen Medium sinusförmig zur Frequenz, so wird sich dementsprechend der Radius eines sphärischen Bubbles ändern. Das heißt, bei positiven Schalldrücken nimmt der Radius ab und es kommt zur Kompression der Microbubbles, wohingegen negative Schalldrücke zu einer Vergrößerung des Radius und somit einer Expansion der Microbubbles führen (s. Abb. 1.3.). Unter solchen linearen Bedingungen verhält sich ein sphärischer Bubble wie ein Oszillator mit einer Resonanzfrequenz f_0 umgekehrt proportional zu seinem Radius r_0 :

$$f_0 \sim 1/r_0$$

Erhöht man die Amplitude des Schalldrucks, beginnen die Microbubbles bei einer bestimmten Frequenz non-linear zu oszillieren und senden harmonische Signale aus (Keller 1989). Während bei hohen positiven Schalldrücken die Kompression der Microbubbles limitiert ist, kommt es bei den höheren negativen Schalldrücken zu einer starken Expansion der asymmetrisch oszillierenden Bubbles, die daraufhin kollabieren und so zerstört werden. Der maximal negative akustische Schalldruck P , der auf einen Bubble einwirkt, ist direkt proportional zur Schallstärke (angegeben als mechanical index = MI, s. Kap. 1.4.3.), demnach wird durch eine Erhöhung der Schallstärke auch die akustische Leistung erhöht, was zur Destruktion der Microbubbles führt (Wei 1997).

Treffen bei kontinuierlicher Beschallung mit einer Frequenz f die Schallwellen in flüssigem Medium auf gashaltige Microbubbles, wird der größte Teil der Schallenergie in das Medium zurückgestreut (*backscatter*), wobei die Bubbles ein

akustisches Schallfeld erzeugen, das neben der fundamentalen Frequenz (f) auch harmonische ($2f, 3f, \dots$), subharmonische ($^{1/2}f, ^{1/3}f \dots$) und ultraharmonische ($^{2/3}f, ^{3/2}f \dots$) Frequenzen enthält. Das Vorhandensein dieser harmonischen und subharmonischen Frequenzen im Spektrum kann als Indikator für non-lineare Oszillationen der Microbubbles gewertet und zur Steigerung des Kontrasteffekts mit harmonischer Bildgebung (*harmonic imaging*) genutzt werden (s. Tab. 1.3.).

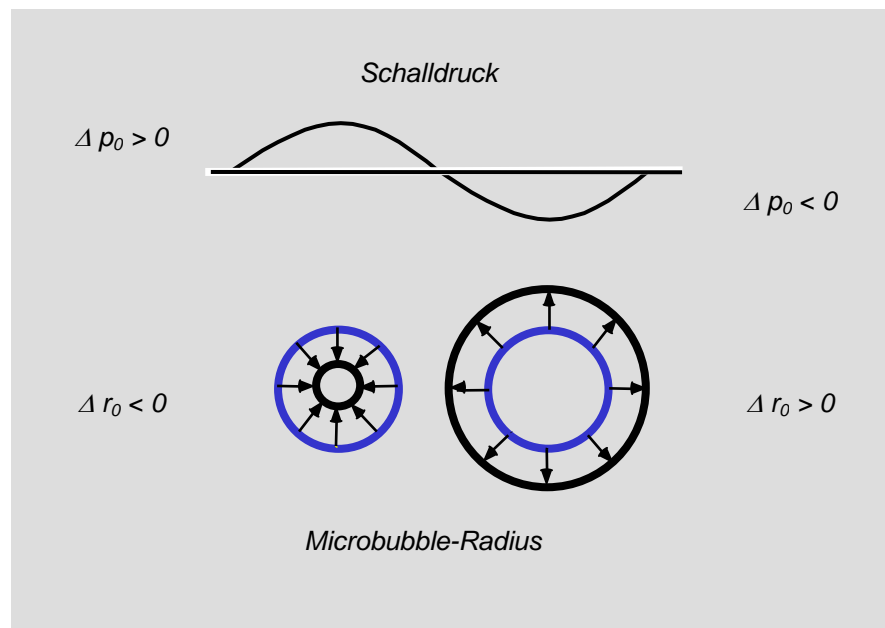


Abb. 1.3.: Verhalten von Microbubbles im akustischen Feld bei niedriger Amplitude

1.4.2.1. Harmonic Imaging

Microbubbles streuen nicht nur mit der vom Schallkopf abgegebenen Frequenz f zurück, sondern senden zusätzlich höhere Frequenzen ($2f, 3f, \dots nf$) aus (de Jong 1991, Burns 1992, Scrope 1993). Diese als harmonisch bezeichneten Frequenzen entstehen durch Resonanz der Microbubbles im Schallfeld (de Jong 1991, Burns 1996) und treten besonders dann auf, wenn die Frequenz des Transducers nahe der Resonanzfrequenz der Microbubbles liegt (Bleeker 1990). Die Resonanzfrequenz der Microbubbles konventioneller Ultraschallkontrastmittel (< 3 MHz) liegt zufällig im Bereich üblicher Transducerfrequenzen. Bei Beschallung beispielsweise mit 2.2 MHz agieren die Microbubbles als aktive Schallquellen und emittieren unter anderem Schallwellen im Bereich der zweiten harmonischen Frequenz, also im Frequenzbereich von 4.4 MHz.

Moderne Schallköpfe sind zumeist sehr breitbandig ausgelegt und zur Registrierung auch dieser hohen Frequenzen einsetzbar. Bei einer Anschallung von 2.2 MHz und einem Empfangskanal von 4.4 MHz werden die Kontrastechos der Microbubbles verstärkt und Signale von Gewebe oder korpuskulären Blutbestandteilen abgeschwächt, da diese mit weitaus geringerer Wahrscheinlichkeit harmonische Frequenzen aussenden (de Jong 1993, Burns 1996). Das Vorhandensein non-linearer Oszillationen von Microbubbles im Schallfeld hat den großen Vorteil, daß mit niedrigeren Frequenzen beschallt werden kann und dadurch die Schallwellen im Gewebe weniger stark abgeschwächt werden: Ultraschall hat bei diagnostischer Anwendung im Gewebe eine mittlere Abschwächung von ~0.3 dB/cm/MHz (Skyba 1998).

Da also niedrigere Frequenzen ausgesandt und höhere harmonische Frequenzen empfangen werden, kommt es mittels harmonic imaging zu einer Reduktion der Echosignale, die nicht non-linear zurückgestreut werden. Dies führt zu einer starken Erhöhung der „signal to noise ratio“ (de Jong 1991, Scrope 1993) und dadurch zu einer Intensivierung des Kontrasteffekts.

MI	P_{\max}	Bubble Behavior	Acoustic Behavior
< 0.1	< 100 kPa	Linear oscillation	Backscatter enhancement
0.1 – 1.0	100 kPa – 1 MPa	Harmonic oscillation	Harmonic backscatter
> 1.0	> 1 MPa	Disruption	Transient harmonic echos

modifiziert aus: Handbook of Contrast Echocardiography 2000

Tab. 1.3.: Verhalten (scattering) von Microbubbles in einem Ultraschallfeld in Abhängigkeit vom Schalldruck und der Schallstärke

1.4.3. Bedeutung des mechanischen Index

Um abschätzen zu können, welcher Energie die Zielstruktur (Microbubble) im Ultraschallfeld ausgesetzt ist, wurde ein Index definiert, der die ungefähre Schallstärke im fokussierten Gewebe reflektiert (AIUM 2000). Diese als mechanischer Index (MI) bezeichnete Größe ist definiert als der maximal negative Schalldruck P_{neg} [MPa] dividiert durch die Quadratwurzel der Anschallungsfrequenz f [MHz]:

$$MI = P_{\text{neg}} / f^{1/2}$$

Der MI beschreibt somit die mechanische Energie, die auf eine Struktur (Microbubble) am Umkehrpunkt des bei der sinusförmigen, periodischen Druckschwankung entstehenden negativen Schalldrucks einwirkt (bei $\frac{3}{4}$ der Periodendauer) (Apfel 1991). Der maximal negative Schalldruck im Gewebe lässt sich jedoch nur abschätzen, da dieser in Abhängigkeit vom beschallten Gewebe, dem Schalldruck und der Geometrie des Ultraschallsektors mehr oder weniger stark variiert. Je größer die Abschwächung der Schallwellen im Gewebe, desto kleiner P_{neg} . Der MI ist für den Fokuspunkt definiert und dort maximal groß. Bei der Berechnung des MI wird eine mittlere Abschwächung im Gewebe von $\sim 0.3 \text{ dB/cm/MHz}$ einkalkuliert, da aufgrund der Abschwächung der Maximalwert des MI vom Fokuspunkt in Richtung Schallkopf verlagert wird. Bei diagnostischer Anwendung von Ultraschall liegt der MI in der Regel zwischen 0.1 und 2.0, jedoch variieren die Angaben des MI bei den einzelnen Ultraschallgeräten herstellerspezifisch und sind deshalb nicht immer vergleichbar. Trotzdem stellt der MI den wichtigsten maschinellen Parameter in der Kontrastecho(kardio)graphie dar.

1.5. Ziel der Dissertation

Das Hauptproblem non-viraler Gentransferstrategien mit Plasmid-DNA stellt die geringe Transfektionseffizienz dar. Mittlerweile wurden eine Reihe nicht-viraler Vektorsysteme entwickelt, die alleine oder in Verbindung mit physikalischen Methoden einen gezielten Gentransfer mit höherer Zellspezifität ermöglichen. Trotzdem lässt die Gentransfereffizienz im Vergleich zu viralen Vektorsystemen noch deutlich zu wünschen übrig.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ein effektives non-virales Gentransfersystem zu entwickeln, das mit Hilfe von Kontrastultraschall gezielt Plasmid-DNA in die Gefäßwand von Koronararterien transferiert ohne die funktionelle Integrität der Endothelzellschicht zu beeinträchtigen.

Unter den physikalischen Methoden zur Erleichterung non-viraler Transfektion steht mit dem Ultraschall eine in der Klinik etablierte bildgebende Methode zur Verfügung, die eine gezielte Fokussierung bestimmter Organbezirke erlaubt. Transiente Sonoporation erleichtert die Transfektion mit Plasmid-DNA in vitro und in vivo. Zudem weiß man, daß Ultraschall gashaltige Einschlüsse in flüssigen Medien aktivieren kann. Durch die Zugabe von stabilisierten, akustisch aktiven Gassphären (Ultraschallkontrastmittel) kann die Schwelle für akustische Kavitation herabgesetzt werden. Dies führt hypothetisch zu einer Steigerung der Sonoporphormance und einer höheren Effizienz dieser Gentransfer-

methode. Durch gezielte ultraschall-induzierte Destruktion von Microbubble-Vektoren (UIMD) könnte somit ein lokaler vaskulärer Gentransfer unter begleitender sonographischer Bildgebung ermöglicht werden.

In dieser Arbeit sollte nun die Praktikabilität dieser Hypothese an einem Perfusionsmodell in vitro überprüft werden. Dabei standen folgende Fragestellungen im Mittelpunkt des Interesses:

1. Kann bei der Herstellung von Microbubbles durch elektromechanische Sonifikation *Plasmid-DNA* in die Albumin-Schale inkorporiert (integriert) und somit ein akustisch aktiver Genvektor konstruiert werden?
2. Ermöglicht die ultraschall-induzierte Destruktion von Plasmid-DNA-beladenen Microbubble-Vektoren (UIMD) einen sicheren und gezielten Gentransfer in die Gefäßwand von Koronararterien an einem in vitro-Perfusionsmodell?
Wenn ja, welchen Einfluß auf die Transfektion haben Änderungen der Perfusion, der Konzentration an Microbubble-Genvektoren und der Ultraschallexpositionszeit?
3. Eignet sich diese Methode zum vaskulären Gentransfer von endothelialer NO-Synthase und wirkt sich eine erfolgreiche eNOS-Genexpression messbar auf die Vasoreaktivität der transfizierten Koronararterien aus?

2. Material und Methoden

2.1. *Herstellung der Microbubbles mittels elektromechanischer Sonifikation von Humanalbumin*

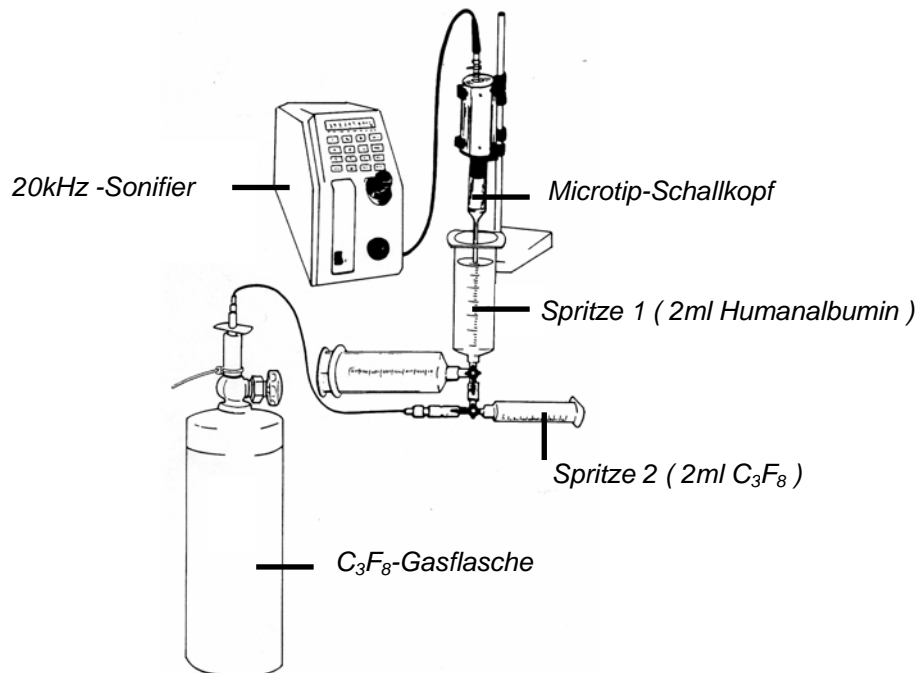
Die Albumin-Microbubbles wurden in Anlehnung an die von Reisner et al. (Reisner 1989) beschriebene Methode hergestellt. Dazu wurden zwei 5ml-Spritzen (Braun) über einen Dreiwegehahn verbunden, so daß diese in einem rechten Winkel zueinander mit einer nach oben offenen Spritze in der Senkrechten an das Stativ einer Beschallungskammer befestigt werden konnten. Die nach oben offene 5ml-Spritze wurde mit 2ml 5% Humanalbumin gefüllt, die dazu horizontal stehende Spritze mit 2ml Gas (konventionelle Raumluft [$N_2=77.1\%$; $O_2=20.8\%$; $Ar:0.9\%$] oder Octafluorpropan [$C_3F_8 >99,9\%$]) aufgezo-gen.

Für die Beschallung des Humanalbumins wurde ein 20kHz-Sonifier (Sonifier II Desintegrator model W-450, Branson Ultrasonic S.A., Genf) verwendet, dessen steriler Schallkopf (Standardmikrotip aus Titan; $\varnothing=3mm$) senkrecht von oben in die mit 2ml Humanalbumin gefüllte Spritze eingebracht und 3mm oberhalb des Kanülenaufsatz platziert wurde (s. Abb. 2.1.).

Die Humanalbuminlösung wurde mit einer Frequenz von 20 kHz und einem output setting von 7 (gemäß Hersteller; duty cycle 30%) für insgesamt 30 s beschallt, initial 20 s ohne Gaszufuhr zur Erwärmung der Lösung und anschließend 10 s unter kontinuierlichem Einstrom des 2 ml-Gasgemisches. Kurz nach Beschallung des Humanalbumins bildeten sich zwei Schichten aus, eine obere schaumige und eine untere milchig-trübe, von deren Mischung 1 ml in unterschiedlichen Volumina nicht-beschallter Humanalbumin-Lösung verdünnt und in einer Perfusorspritze aufgezogen wurde.

2.1.1. *Herstellung Plasmid-DNA-beladener Microbubbles*

20µg Plasmid-DNA (pcDNA3.1-Kontrollvektor, pcDNA3.1-LacZ, pcDNA3.1-eNOSmtS1177D; pcDNA3.1-myc-his-eNOSmtS1177D) wurden in 2ml Humanalbumin gelöst und gemäß 2.1.1. beschallt.



Schema nach Porter et al. 1995, modifiziert. Erläuterung siehe Text.

Abb. 2.1.: *Herstellung von Albumin-Microbubbles durch elektromechanische Sonifikation*

2.1.2. Nachweis der spezifischen DNA-Bindung an die Albuminschale der Microbubbles

Propidium-Iodid erzeugt durch Bindung an DNA eine rote Fluoreszenz, die unter Epiillumination mit einem Grünfilter im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden kann.

2mg DNA (Sigma) wurden in 200µl PBS gelöst und mit 1µg Propidium-Iodid versetzt. Nach Aussalzen der DNA mit 10µl NaCl (5M) wurde die DNA in 500µl 95% Ethanol gefällt, 5 min bei 14000g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dann erfolgte die Zugabe von 500µl 70% Ethanol und erneute Zentrifugation für 1 min bei 14.000 g. Nach Absaugen des Überstandes wurde das resultierende Pellet in 2 ml 5% Humanalbumin aufgenommen und gemäß Kapitel 2.1.1. zur Herstellung der Microbubbles eingesetzt. Die Analyse der Microbubbles auf DNA-Bindung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch bei einer Wellenlänge $\lambda = 546\text{nm}$.

2.2. Präparation der Koronararterien

Vom Schlachthof (Aschaffenburg) erworbene Schweineherzen wurden direkt nach Explantation in 4°C kalte Krebs-Henseleit-Lösung (119mM NaCl; 25mM NaHCO₃; 4.7mM KCl; 1.6mM CaCl₂; 1.2mM KH₂PO₄; 1.2mM MgSO₄; 12mM Glucose; pH=7.4) eingelegt und ins Labor transportiert. Anschließend wurden die Koronararterien von Fett- und Bindegewebe freipräpariert, exzidiert und die Gefäßabgänge mit chirurgischen Clips verschlossen. Die präparierten Gefäßsegmente wurden an beiden Enden kannuliert und in spezielle Gefäßhalterungen eingehängt. Die Länge der Gefäßsegmente betrug ~40mm bei einem mittleren externen Diameter von 2.4-2.8mm.

2.3. Ex vivo-Transfektion von Koronararterien

2.3.1. Plasmide

Die dominant negative eNOS-Mutante (eNOS-S1177D) wurde über die EcoRI- und HindIII-Restriktionsstellen in den Vektor (pcDNA3.1; Invitrogen, NV Leek, Niederlande) mit oder ohne Myc 6x-Histidin-Markierung (*myc-his*) unter Kontrolle des CMV-Promotors kloniert.

Transfektion der Koronararterien erfolgte mit pcDNA3.1-lacZ (kodiert β -Galaktosidase) und pcDNA3.1-Kontrollvektor ohne Insert, oder mit pcDNA3.1-eNOSmtS1177D (\pm *myc-his*) und pcDNA3.1-Kontrollvektor ohne Insert.

2.3.2. Versuchsaufbau

Die an beiden Enden kannulierten und in spezielle Gefäßhalterungen montierten Koronararterien (s. 2.2.) wurden vollständig in ein Organbad mit DMEM eingehängt und über einen Infusionsschlauch an den Perfusor angeschlossen (s. Abb. 2.2.A). Der an ein Stativ fixierte Schallkopf wurde in das Organbad eingelassen und die horizontal platzierten Gefäßsegmente bei einer totalen Bildtiefe von 8cm in 5cm Tiefe fokussiert, wobei der Ultraschallsektor im Fokus 3.6cm x 2.7cm betrug (s. Abb. 2.2.C).

2.3.3. Versuchsprotokoll

Die Koronararteriensegmente wurden initial mit je 2ml DMEM und PBS durchgespült und anschließend mit pcDNA-beladenen Microbubbles bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 2ml/min (10ml/min respektive) perfundiert. Nach distalem Ausströmen der ersten Microbubbles wurde das Gefäßsegment kontinuierlich für 5s oder 30s mit hochenergetischem diagnostischem Ultraschall gescannt (s. Abb. 2.2.B). Dazu wurde ein für die Echokardiographie kommer-

ziell erhältliches Ultraschallgerät (System Five, GE Vingmed, Horten, Norway) verwendet. Die Beschallung erfolgte mit harmonischer 2D-Bildgebung (second harmonic imaging) bei einer Anschallungsfrequenz von 2.2MHz und einer Empfangsfrequenz von 4.4MHz sowie einer zeitlichen Auflösung von ~173 Bildern/s ($\cong 5.78\text{ms}$). Der mechanische Index (MI) betrug gemäß Hersteller 1.2. Nach Beschallung und Perfusionsstop wurden die Gefäßsegmente mit je 2ml PBS und DMEM durchgespült und anschließend mit 2% FCS-haltigem MEM für 18-20 Stunden bei 37°C perfundiert (5ml/h).

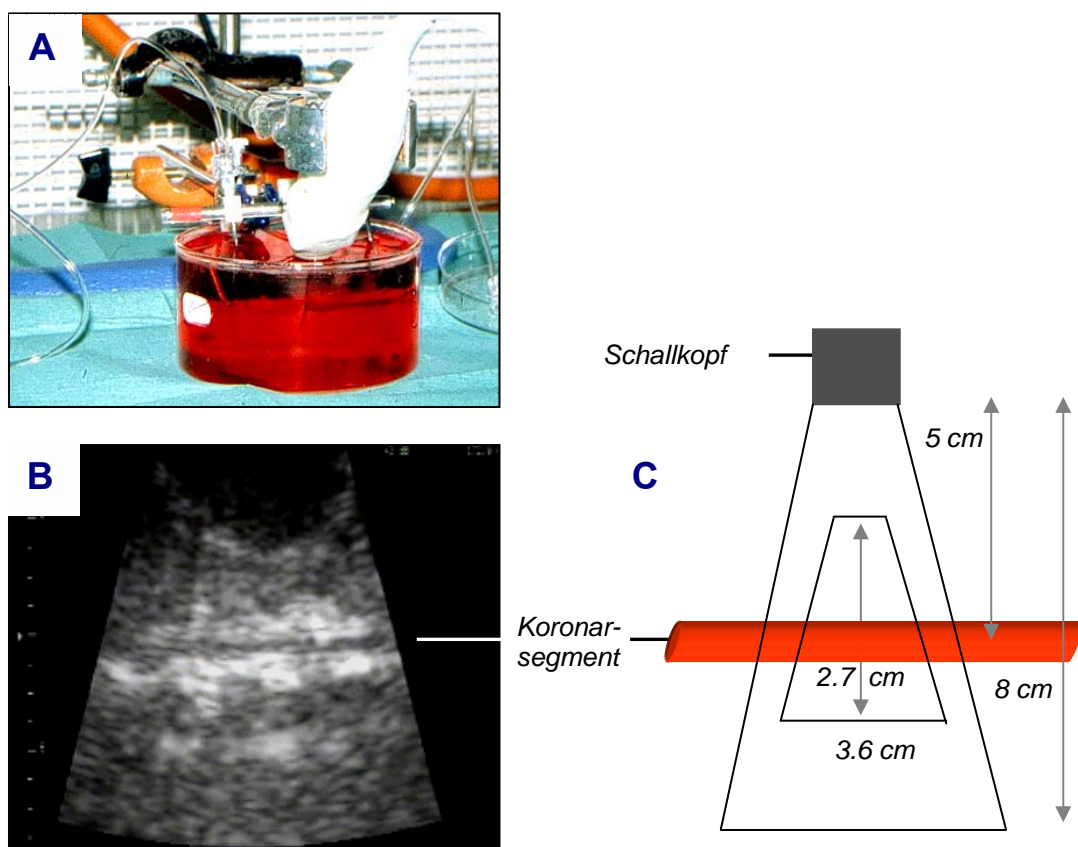


Abb. 2.2.: Ex vivo-Perfusionsmodell zur UIMD-Transfektion an Koronararterien

An spezielle Gefäßperfusionshalterungen kannulierte Koronararterienssegmente sind in ein Organbad mit DMEM eingelassen und über einen Infusionsschlauch an den Perfusor angeschlossen. Der an ein Stativ fixierte Schallkopf ist vollständig in das Organbad eingelassen (A). Die horizontal platzierten Gefäßsegmente werden bei einer totalen Bildtiefe von 8cm in 5cm Tiefe fokussiert, der Ultraschallsektor im Fokus beträgt 3.6cm x 2.7cm (C). Harmonic 2D-Mode-Registrierung (B).

2.4. *β -Galaktosidase-Aktivitätsmessung*

LacZ ist ein bakterielles Gen und wird häufig als Reporterplasmid zur Transfektion eukaryontischer Zellen verwendet, da das Genprodukt β -Galaktosidase gegen Proteolyse in Zelllysaten weitgehend resistent ist und die Enzymaktivität leicht gemessen werden kann. Das Enzym β -Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse von β -Galaktosiden wie Ortho-nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG). Hydrolyse von ONPG zu ONP⁻ produziert eine leichte Gelbfärbung mit einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge $\lambda = 420\text{nm}$.

Die Aktivität der β -Galaktosidase wurde nach Proteinisolation von pcDNA3.1-Leervektor oder pcDNA3.1-LacZ transfizierten Koronararterien im Überstand mit Hilfe eines kommerziell erworbenen Kits (Invitrogen) ermittelt. Dazu wurden 15 μl Proteinüberstand beziehungsweise 15 μl dH₂O als Referenz mit 15 μl dH₂O und 200 μl β -Mercaptoethanol (14.3M) enthaltendem Puffer (0.6M Na₂HPO₄-7H₂O; 0.4M Na₂HPO₄-H₂O; 0.1M KCl; 10mM MgSO₄-7H₂O, pH=7) versetzt und nach Zugabe von 70 μl ONPG [4mg/ml] für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 500 μl Na₂CO₃ (1M) gestoppt und die Absorption bei einer Wellenlänge $\lambda = 420\text{ nm}$ gegen die Referenz gemessen.

2.5. *LacZ-Färbung*

Erfolgreiche Transfektion mit pcDNA-LacZ resultiert in der Expression rekombinanter β -Galaktosidase, die nach Zugabe des Substrats 5-bromo-4-chloro-3-inolyl-D- β -galaktopyranosid (X-Gal) aufgrund der entstehenden Blaufärbung detektiert werden kann.

Transfizierte Gefäßsegmente wurden zweimal mit PBS durchgespült und anschließend für 10min mit 0.25% Glutaraldehyd in PBS fixiert. Nach Längsinzision und kurzem Spülen mit PBS folgte die Inkubation mit X-Gal-Lösung (100ml: 165mg K₃[Fe (CN)₆], 210mg K₄[Fe (CN)₆], 0.2ml MgCl₂, 10ml PBS, 2.5ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-inolyl-D- β -galaktopyranosid)) für 18 Stunden bei 37°C. Anschließend wurden die fixierten Gefäßsegmente mit einer Digitalkamera (Canon) fotografiert und zur histochemischen Lokalisation von β -Galaktosidase routinemäßig mit 4% Formaldehyd nachfixiert, in Paraffin eingebettet und gemäß Standardmethoden geschnitten. Die histologischen Schnitte wurden mit Kernechtrot gegengefärbt und lichtmikroskopisch auf positive β -Galaktosidase-Färbung (blaue Kerne) und Morphologie untersucht.

2.6. Messung der Vasoreaktivität

Die Koronararteriensegmente wurden gemäß 2.3.3. mit pcDNA3.1-eNOS $_{mt}$ oder pcDNA3.1-Kontrollvektor transfiziert und auf ihre Vasoreaktivität hin untersucht.

Dazu wurden aus dem ultraschall-exponierten Sektor der transfizierten Gefäßsegmente zwei 4mm breite Ringe exzidiert und zur isometrischen Kraftmessung zwischen einen Kraftüberträger (Scaime, France) und eine fixe Halterung eingehängt. Die Inkubation erfolgte in einem 10ml-Organbad bei 37°C mit oxygenierter Krebs-Henseleit-Lösung (95% O₂; 5% CO₂; pH=7.4), während eine passive Vordehnung von 5g über eine Äquilibrationsperiode von 30min eingestellt wurde. Anschließend wurden die Ringe einer repetitiven Gabe K⁺-reicher Krebs-Henseleit-Lösung (80mM KCl) mit intermittierenden Auswaschphasen bis zum Erreichen einer konstant maximalen Vorkontraktion ausgesetzt.

Voraussetzung für die Detektion einer möglicherweise erhöhten NO-Synthese nach Transfektion mit pcDNA3.1-eNOS $_{mt}$ stellt die Integrität des Endothels dar, die mit Bradykinin über rezeptorvermittelte und somit endothelabhängige Relaxation überprüft wurde.

Nach Auswaschen der K⁺-reichen Lösung wurden die Gefäßringe mit PGF_{2 α} (1 μ M) vorkontrahiert und anschließend mit Bradykinin (1 μ M) relaxiert (s. Abb. 2.3. A), wobei Ringe verworfen wurden, die auf Bradykinin mit <70% Relaxation reagierten. Die Gefäßringe wurden erneut ausgewaschen und mit PGF_{2 α} (0.1 μ M) vorkontrahiert (~5-10% der KCl-induzierten Kontraktion bei nicht-behandelten, gesunden Koronargefäßen). Direkt anschließend erfolgte die Gabe des NO-Synthase-Inhibitors N^ω-monomethyl-L-Arginin (300 μ M) (s. Abb. 2.3. B), was zu einer additiven Tonuserhöhung führt, die von der PGF_{2 α} -induzierten Vorkontraktion abhängig ist (Fleming 1999). Anhand der graphischen Registrierung wurde die vasokonstriktorische Antwort nach Gabe von PGF_{2 α} relativ zur maximalen KCl-induzierten Vorkontraktion, sowie die vasokonstriktorische Antwort nach Gabe von LNMA relativ zur PGF_{2 α} -induzierten Vorkontraktion ausgewertet.

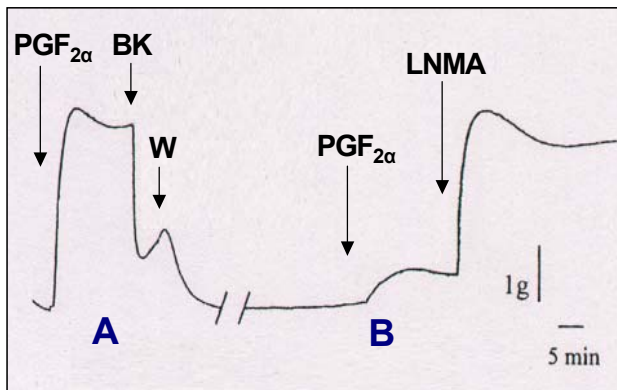


Abb. 2.3.:
Graphische Registrierung zur
isometrischen Kraftmessung

Schema modifiziert nach Fleming
et al. 1999, Erläuterung siehe Text.

$PGF_{2\alpha}$ - Prostaglandin $F_{2\alpha}$
BK - Bradykinin
W - Auswaschen
LNMA - N^{ω} -monomethyl-L-Arginin

2.7. Nachweis der Endothelintegrität nach Ultraschallexposition

Um sicherzustellen, daß ultraschall-induzierte Destruktion von Microbubbles keine funktionellen Endothelläsionen verursacht, wurde eine Konzentrations-Relaxationskurve für die vasodilatatorische, endothelabhängige Substanz Bradykinin erstellt und ultraschall-exponierte versus nicht exponierte, mit pcDNA-beladenen Microbubbles perfundierte Gefäßsegmente verglichen.

Nach repetitiver Gabe K^+ -reicher Krebs-Henseleit-Lösung wurden die Gefäßringe ausgewaschen, mit $PGF_{2\alpha}$ ($1\mu M$) auf ~80% vorkontrahiert und anschließend sukzessive mit kumulativen Gaben von Bradykinin (10^{-11} - 10^{-5} mol/l) relaxiert. Anhand der Registrierung der isometrischen Kraft (s. Abb. 2.4.) wurden die vasodilatatorischen Antworten nach jeder Bradykininkonzentration relativ zur maximalen KCl-induzierten Vorkontraktion ausgewertet und graphisch gegen die Bradykininkonzentration aufgetragen.

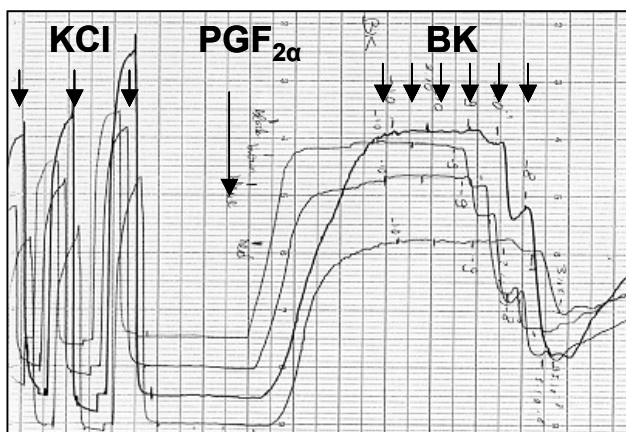


Abb. 2.4.:
Messung der NO-vermittelten
endothel-abhängigen Vaso-
relaxation

Original Schreiberregistrierung der
isometrischen Kraftänderung über
die Zeit. Erläuterung siehe Text.

KCl - Kaliumchlorid
 $PGF_{2\alpha}$ - Prostaglandin $F_{2\alpha}$
BK - Bradykinin

2.8. Proteinanalyse

2.8.1. Proteinisolation aus Koronararterien

Transfizierte Koronararterien wurden zweimal mit PBS perfundiert. Nach Entfernung der chirurgischen Gefäßclips wurden aus dem ultraschall-exponierten Sektor 4mm breite Ringe exzidiert, in flüssigem Stickstoff pulverisiert und in Puffer (10mM Tris/HCl, pH=8.0; 5mM EDTA, pH=8.0; 0.32M Sucrose; 1% Triton X-100; 2mM DTT; 1mM PMSF) bei 4°C für 30min lysiert. Nach Zentrifugation (14000g, 15min, 4°C) folgte die Bestimmung der Proteinkonzentration im abgenommenen Überstand (s. 2.7.2.).

2.8.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

798µl dH₂O plus 2µl Probe beziehungsweise 800µl dH₂O als Referenz wurden mit 200µl Protein-Assay Färbereagenz (Bio Rad, München) versetzt und bei Raumtemperatur für 5min inkubiert. Die folgende Messung der Absorption des entstandenen Protein-Indikatorkomplexes erfolgte im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge $\lambda = 595\text{nm}$. Die entgültige Proteinkonzentration wurde anhand einer zuvor mit Rinderalbumin erstellten Eichkurve ermittelt.

2.8.3. Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Moleküle lassen sich aufgrund ihrer Größenunterschiede durch SDS-(Sodium-dodecylsulfate-) Polyacrylamidgelelektrophorese trennen, wobei die Porengröße des Gels die Geschwindigkeit limitiert, mit der sich die Proteine im elektrischen Feld bewegen, so daß diese in Abhängigkeit ihrer Kettenlänge getrennt werden.

Für die Elektrophorese wurden zwei speziell angefertigte Glasplatten durch 1.5mm dicke Spacer voneinander getrennt und in einem System fixiert. Die Trenngellösung (1.5M Tris/HCl, pH=8.8; 0.4% SDS) wurde zwischen die Glasplatten eingefüllt und während der Polymerisation mit 0.1% SDS überschichtet. Nach Polymerisation folgte die Entfernung der SDS-Lösung, das Einfüllen der Sammelgellösung (1M Tris/HCl, pH=6.8; 0.4% SDS) und Einsetzen des Probenkamms. Die Proteinproben wurden mit 2x Probenpuffer (125mM Tris/HCl, pH=6.8; 4% SDS; 20%Glycerin; 10mM DTT; 0.02% Bromphenolblau) versetzt und 5min bei 100°C denaturiert. Es folgte kurzes Anzentrifugieren für 1min bei 14000g und Ladung der Proben auf das in Laufpuffer (0.25M Tris; 0.96M Glycin; 1% SDS) eingebrachte Gel. Bei einer Stromstärke von 50mA und maximaler Spannung von 100V (entspricht einer Leistung von 5W) betrug die Laufzeit etwa 1.5 Stunden.

2.8.4. *Western Blot*

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine sind durch die Bindung ihrer Aminosäuren an das anionische Detergenz SDS negativ geladen; im elektrischen Feld wandern sie zur Anode und können somit auf eine Membran übertragen werden, an die sie über hydrophobe Wechselwirkungen haften und durch Immundetektion sichtbar gemacht werden können.

Um Proteine höheren Molekulargewichts von dem Polyacrylamidgel auf eine Membran zu transferieren, wurde der Wet-Blot verwendet. Eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore, Eschborn) wurde für 5s in 100% Methanol und 2min in dH₂O vorbehandelt und dann in Wet-Blotting-Puffer (0.05M Tris; 0.38M Glycin; 0.1% SDS; 20% Methanol) gewässert. Das Gel und 6 Whatman 3 MM Papiere (Whatman International, Maidstone, England) wurden kurz in Puffer getaucht und in Form eines luftblasenfreien Sandwichkomplexes (drei Whatman 3MM Papiere, PVDF-Membran, Gel und drei weitere Whatman 3MM Papiere) zwischen zwei „scotch pads“ eingeklemmt und in der mit Puffer gefüllten Wet-Blot-Apparatur (Bio Rad Transblot, Heidelberg) eingehängt. In dieser wurde nun bei 4°C und einer Spannung von 70V der Western Blot für 1.5 Stunden geplotet.

2.8.5. *Immundetektion von Western Blots*

Alle folgenden Schritte zur Immundetektion wurden auf einem Schüttelinkubator (IKA-Labortechnik) durchgeführt. Nach dem Proteintransfer auf die PVDF-Membran wurde diese für 2 Stunden in TBS/Tween (50mM Tris/HCl, pH=8.0; 150mM NaCl; 2.5mM KCl; 0.1% Tween-20) mit entweder 3% BSA oder 5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur zwecks Blockierung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert und anschließend dreimal für je 10min mit TBS/Tween gewaschen. Nach 2-stündiger Inkubation mit dem Erst-Antikörper gegen das zu untersuchende Protein folgte erneut dreimaliges Waschen für 10min mit TBS/Tween. Dann wurde die Membran für 1 Stunde mit einem Peroxidase-konjugierten IgG-Antikörper gegen den Fc-Anteil des Erst-Antikörpers inkubiert und anschließend 3x 15min mit TBS/Tween gewaschen. Die Menge der gebundenen Peroxidase wurde nun mit ECL-System (Amersham, Braunschweig) detektiert und auf speziellen Filmen (ECL-Hyperfilm, Amersham) sichtbar gemacht. Eine Zusammenfassung der verwendeten Antikörper und Lösungen zeigt Tab. 2.1.

1. Antikörper	Blockierung	Verdünnung 1. Antikörper	2. Antikörper	Verdünnung 2. Antikörper
eNOS (Santa Cruz)	3% BSA in TBS/ Tween	1:1000 in 3% BSA in TBS/ Tween	Anti-rabbit	1:4000 in 3% BSA in TBS/ Tween
c-Myc (Santa Cruz)	5% Magermilch in TBS/ Tween	1:250 in 5% Magermilch in TBS/Tween	Anti-mouse	1:4000 in 5% Magermilch in TBS/ Tween
Aktin (Boehringer Mannheim)	3% BSA in TBS/ Tween	1:2000 in 3% BSA in TBS/ Tween	Anti-mouse	1:4000 in 3% BSA in TBS/ Tween

Tab. 2.1.: Antikörper

2.9. Substanzen und Materialien

Humanalbumin (Albumin-Lösung 5 BaWü [DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg, Baden-Baden]), DNA- Na^+ -Salz (Na^+ :6.2%; H_2O :6.4%; Sigma, Deisenhofen), Octafluorpropan (C_3F_8 : $M=188\text{g/mol}$ Vol% > 99.9; MERK-Schuchardt, Hohenbrunn).

U46619 (9,11-dideoxy-11 α ,9 α -epoxymethano-prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$; Upjohn, USA), LNMA (N^ω -monomethyl-L-Arginin; Alexis, Grünberg). Alle anderen Substanzen zur Messung der Vasoreagibilität (Sigma).

Phosphatpuffer (PBS; Gibco, Hamburg), DMEM / MEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium; Clonetics/Cell System), Foetales Kälberserum (FCS; Boehringer Mannheim).

2.10. Statistik

Die erhobenen Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Die n-Zahlen beziehen sich auf die Anzahl separat durchgeführter Experimente. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem ungepaarten t-Test mit der Software von Excel bei der Signifikanzberechnung zwischen zwei Werten oder mit einer Varianzanalyse mit ANOVA und nachfolgendem LSD-Test (Least Significant Difference-Test) mit der Software von SPSS bei der Signifikanzberechnung zwischen mehreren Werten. Ein p-Wert kleiner 0.05 wurde als signifikant bewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung von Microbubbles als Genvektoren

3.1.1. Mikroskopische Analyse der Albumin-Microbubbles

Die Microbubbles wurden gemäß 2.1.1. mittels elektromechanischer Sonifikation von 5% Humanalbumin hergestellt. Dabei kommt es vor allem während der Insufflation des Gases zur Bildung kleiner, von einer dünnen Schale umhüllter Gasbläschen (s. Abb 3.1. A). Die Schale der Microbubbles besteht aus hitzebehandeltem Albumin, das aufgrund der durch die Sonifikation entstehenden Wärme denaturiert (Vandenberg 1994). Die durchschnittliche Temperatur der Microbubble-Lösung betrug direkt nach Sonifikation etwa $55.5 \pm 0.49^\circ\text{C}$ (Mittelwert \pm SEM; $n=8$). Die Konzentration an Microbubbles wurde mit Hilfe eines digitalen Zellcounters gemessen und betrug $2.18 \pm 0.46 \times 10^8/\text{ml}$ (Mittelwert \pm SEM; $n=4$). Die Abbildung 3.1. B zeigt in Blutplasma suspendierte Microbubbles im Vergleich zu humanen Erythrozyten. Mit einem mittleren Durchmesser von $3.0 \pm 1.5 \mu\text{m}$ sind die Microbubbles etwas kleiner als Erythrozyten.

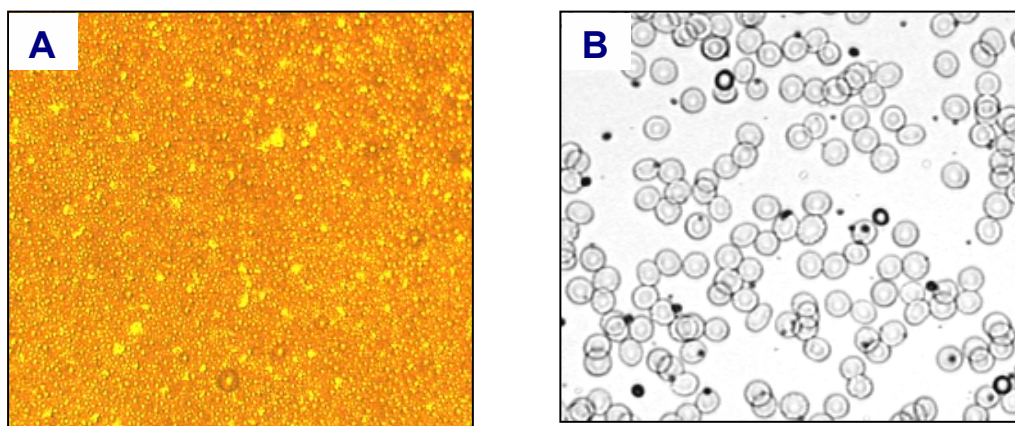


Abb. 3.1.: Octafluorpropanhaltige Albumin-Microbubbles

2ml Humanalbumin wurden mit einem Sonifier bei einer Frequenz von 20kHz für insgesamt 30s beschallt, davon 10s unter kontinuierlichem Einstrom von 2ml Octafluorpropan gas. Anschließend wurde die beschallte Humanalbuminlösung verdünnt und lichtmikroskopisch auf Microbubbles analysiert.

A. Microbubbles, 40fache Vergrößerung

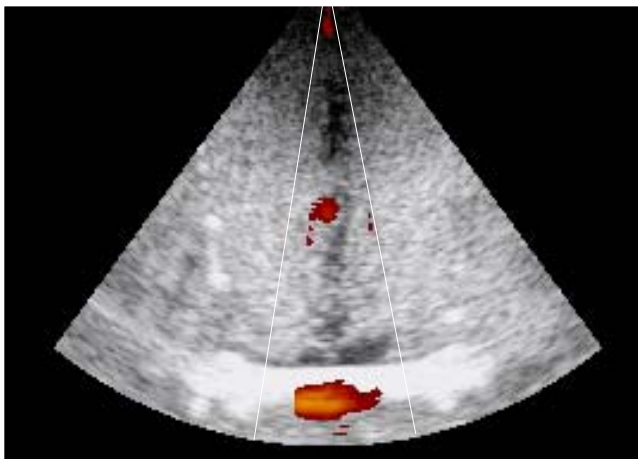
B. Microbubbles im Vergleich zu humanen Erythrozyten, 100fache Vergrößerung.

3.1.2. Nachweis der Echogenität und Zerstörbarkeit von Albumin-Microbubbles

Das Verhalten von Microbubbles im Schallfeld hängt vor allem von der Schallausgangsleistung ab, die positiv mit dem maximal negativen Schalldruck

korreliert und als mechanischer Index (MI) angegeben wird (s. Kap. 1.4.3.). Bei niedriger Schallausgangsleistung oszillieren die Microbubbles non-linear und senden harmonische Frequenzen aus, welche die Basis der kontrastspezifischen harmonischen Bildgebung darstellen. Bei ausreichend hohen negativen Schalldrücken ($>1\text{MPa}$; $\text{MI}>1.0$), wie sie bei der klinischen Anwendung mit dem Harmonic-Power-Doppler-Imaging erzielt werden können, kommt es zur Zerstörung der Microbubbles, was zu einem starken Power-Doppler-Signal führt („loss of correlation“-Prinzip).

Um diesen Effekt zu demonstrieren, wurden in einem mit Wasser gefüllten Meßbecher die Microbubbles suspendiert und mit einer Frequenz von 1.7 MHz bei einem mechanischen Index von 0.4 beschallt (s. Abb. 3.2.). Dann wurde durch Anlegen des Harmonic-Power-Dopplers (HPD) die Schallausgangsleistung in diesem Sektor gezielt erhöht, was zu einer sichtbaren Zerstörung der Microbubbles führte (s. Abb. 3.2., Bildmitte). Außerhalb des angelegten Sektors blieb die intensive, weitgehend homogene Kontrastierung durch intakte Microbubbles erhalten. Damit konnte gezeigt werden, daß mit diagnostischem Ultraschall die Bubbles nicht nur sichtbar gemacht, sondern auch gezielt zerstört werden können.



**Abb. 3.2.:
Gezielte Destruktion von Micro-
bubbles**

In einem Wasserbad suspendierte Microbubbles wurden im Second Harmonic Imaging-Modus (1.7MHz/ 3.4MHz; 21.4 fps; Focus = 7cm) bei niedriger Schallausgangsleistung ($\text{MI} = 0.4$) beschallt.

Gleichzeitig wurde im gekennzeichneten Sektor mit höherenergetischem Harmonic-Power-Doppler gescannt.

3.1.3. Nachweis der spezifischen Bindung von DNA an Microbubbles

Um zu untersuchen, ob DNA an Albumin-Microbubbles binden kann, wurden unter Zugabe von Propidium-Iodid markierter DNA die Microbubbles hergestellt (s. 2.1.3.) und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Propidium-Iodid erzeugt durch Bindung an DNA eine rote Fluoreszenz, die unter Epiillumination mit einem Grünfilter im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden

kann. Wie Abbildung 3.3. A zeigt, ist die DNA spezifisch in die dünne Proteinschale der Microbubbles integriert. Um eine mögliche Autofluoreszenz der Bubbles auszuschließen, wurden als Negativkontrolle Microbubbles ohne DNA hergestellt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert (s. Abb. 3.3. B).

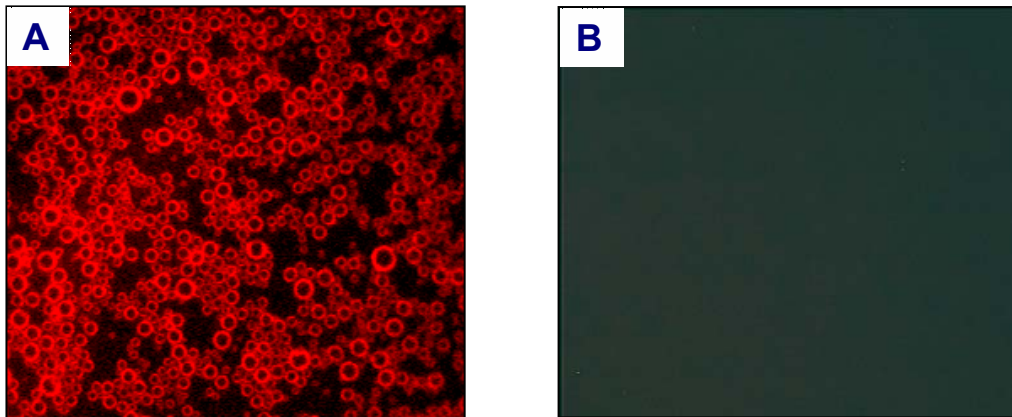


Abb. 3.3.: DNA bindet an die Albuminschale der Microbubbles

Microbubbles wurden entweder mit (A) oder ohne (B) Zugabe von Propidium-Iodid markierter DNA hergestellt und fluoreszenzmikroskopisch bei einer Wellenlänge von 546nm auf Bindung an DNA (rote Fluoreszenz) analysiert. 100fache Vergrößerung.

3.2. Gentransfektion durch ultraschall-induzierte Zerstörung von LacZ-Plasmid-DNA- beladenen Microbubble-Vektoren (UIMD)

Nachdem gezeigt werden konnte, daß bei der Herstellung von Microbubble-Vektoren durch elektromechanische Sonifikation die DNA in die Proteinschale integriert werden kann, wurde nun untersucht, ob deren Zerstörung durch hochenergetischen Ultraschall einen gezielten Gentransfer in die Gefäßwand von Koronararterien ermöglicht.

3.2.1. Nachweis der Genexpression nach UIMD-Transfektion mit pcDNA-LacZ

Dazu wurden die Koronararteriensegmente gemäß 2.3.3. mit pcDNA-LacZ-beladenen Microbubble-Vektoren bei einer Flußrate von 2ml/min perfundiert und diagnostischem Ultraschall ausgesetzt. Die Konzentration an Plasmid-DNA pro ml Microbubble-Suspension betrug 2µg pcDNA-LacZ bzw. 2µg pcDNA-Kontrollvektor. Nach Transfektion wurden die Gefäßsegmente mit X-Gal angefärbt (s. Abb. 2.5.) und mit einer Digitalkamera photographiert, bevor histologische Schnitte angefertigt wurden.

Die Digitalaufnahme des LacZ-transfizierten Gefäßes zeigt eine eindeutige Blaufärbung im Ultraschallsektor (s. Abb. 3.4. A). Man erkennt außerdem, daß die Blaufärbung in Flußrichtung an Intensität verliert, was darauf hindeutet, daß die Bubble-Konzentration durch ultraschall-induzierte Zerstörung der Microbubbles im Verlauf weiter abnimmt. Histologisch konnte die β -Galaktosidase spezifisch in den Endothelzellen lokalisiert werden, dabei waren mehr als 90% der Endothelzellen angefärbt (s. Abb. 3.4. B). Vereinzelt waren auch glatte Muskelzellen der Media und adventitielle Fibrozyten blau angefärbt (nicht gezeigt). Vektor-transfizierte Gefäße zeigten weder makroskopisch noch histologisch eine Blaufärbung (s. Abb. 3.4 C und 3.4 D).

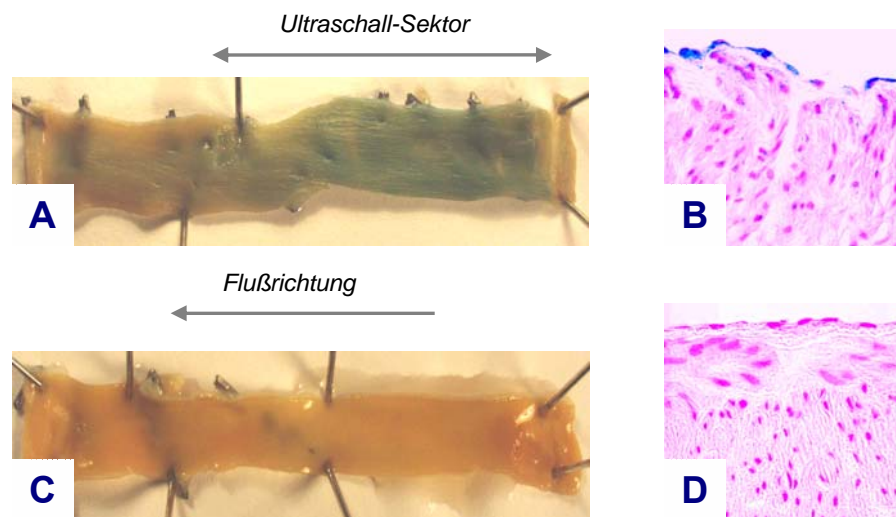


Abb. 3.4.: UIMD-Transfektion mit pcDNA-LacZ führt zur Expression von β -Galaktosidase

Nach ultraschall-unterstützter Transfektion mit 2 μ g pcDNA-LacZ bzw. pcDNA-vector/ml Microbubble-Suspension bei einer Perfusionsrate von 2ml/min [USE= 5s, 1.2MI, 2.2/4.4MHz, 173fps] wurden die Koronararteriensegmente für 18h mit 2% FCS-haltigem MEM perfundiert und anschließend mit X-Gal inkubiert. Blaufärbung zeigt Expression von rekombinanter β -Galaktosidase an.

- A.** Makroskopische Digitalaufnahme eines LacZ-transfizierten Gefäßsegments zeigt Expression von β -Galaktosidase im ultraschall-exponierten Sektor (n=11).
- B.** Histologische Lokalisation der β -Galaktosidase nach Gegenfärbung mit Kern-echtrot: Homogene Blaufärbung der Endothelzellschicht (n = 3). 100fache Vergrößerung.
- C. und D.** Repräsentative Digitalaufnahme und Histologie eines vector-transfizierten Kontrollgefäßes zeigen keine β -Galaktosidase-Färbung (n = 3).

3.2.2. Effekt von Ultraschall und Microbubbles auf die Transfektion mit pcDNA-LacZ

Nachdem gezeigt werden konnte, daß eine Transfektion von Koronararterien durch Ultraschallexposition in Anwesenheit von pcDNA-LacZ-beladenen Microbubble-Vektoren zu einer Expression rekombinanter β -Galaktosidase führt, wurden nun die Effekte von Ultraschall und Microbubbles auf die Transfektion quantitativ mit Hilfe eines β -Galaktosidase-Enzym-Assays untersucht.

Die Transfektion der Koronararteriensegmente erfolgte wie unter 2.3.3. beschrieben entweder mit 2 μ g pcDNA-LacZ/ml Microbubble-Suspension \pm USE oder mit 2 μ g pcDNA-LacZ/ml hitze-unbehandelter Humanalbuminlösung +USE bei einer Perfusionsrate von 2ml/min. Aus den transfizierten Gefäßsegmenten wurde gemäß 2.8.1. Proteinextrakt isoliert und die β -Galaktosidase-Aktivität gemessen (s. Kap. 2.4.).

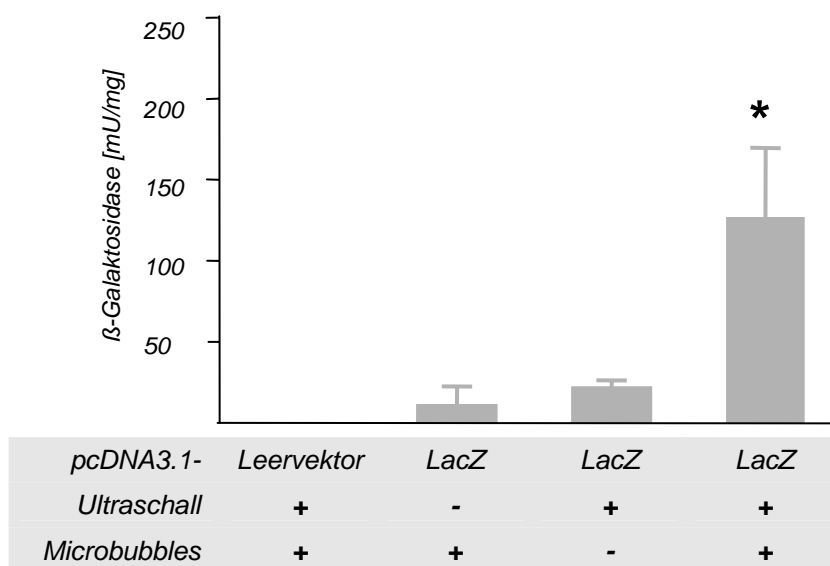


Abb. 3.5.: Effekt von Ultraschall und Microbubbles auf die Transfektion

Koronararteriensegmente wurden mit 2 μ g pcDNA-LacZ/ml Microbubble-Suspension \pm USE bzw. 2 μ g pcDNA-LacZ/ml hitze-unbehandelter Humanalbuminlösung + USE transfiziert [USE = 5 s, 1.2 MI, 2.2/ 4.4 MHz, 173 fps; PR = 2ml/min] und anschließend für 18 h mit 2% FCS-haltigem MEM perfundiert. Nach Proteinisolation wurde mit Hilfe eines β -Gal-Assays die Aktivität der β -Galaktosidase im Proteinextrakt bestimmt (Mittelwerte \pm SEM; n = 3; *p < 0.05 versus USE ohne Microbubbles).

Wie Abbildung 3.5. zeigt, führt die alleinige Perfusion mit pcDNA-LacZ-beladenen Microbubble-Vektoren ohne Anwendung von Ultraschall zu keinem signifikanten Anstieg der β -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zur Transfektion mit dem Kontrollvektor. Ultraschallexposition der Koronararteriensegmente unter

Perfusion mit einer Bubble-freien, pcDNA-LacZ-haltigen Humanalbuminlösung konnte die Enzymaktivität etwas steigern, jedoch nicht signifikant gegenüber Kontrollvektor und Transfektion ohne Ultraschall. Im Vergleich dazu führte die Ultraschallexposition in Anwesenheit von pcDNA-LacZ-beladenen Microbubbles zu einer signifikanten, etwa 12-fachen Erhöhung der β -Galaktosidase-Aktivität. Ultraschall per se steigert die Genexpression nach Transfektion mit Plasmid-DNA. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Plasmid-DNA-beladenen Microbubbles wird die Transfektionseffizienz um ein Vielfaches erhöht, woraus sich schließen läßt, daß die aufgrund der Interaktion von Microbubbles mit dem Ultraschallfeld entstehenden physikalischen Effekte (s. Kap. 1.4.1.) wesentlich an der Transfektion beteiligt sind.

In einer weiteren Versuchsreihe konnte gezeigt werden, daß die Transfektion [USE = 5s, 1.2 MI, 2.2/ 4.4 MHz, 173 fps; PR = 2ml/min; C_p = 2 μ g/ml] mit luftgefüllten im Vergleich zu octafluorpropanhaltigen pcDNA-LacZ-beladenen Microbubbles zu keinem signifikanten Unterschied der β -Galaktosidase-Aktivität führt (114.67 ± 60.15 mU/mg vs 123.75 ± 54.50 mU/mg).

3.2.3. *Einfluß der Plasmid-DNA-Konzentration und der Perfusionsrate auf die UIMD-Transfektion mit pcDNA-LacZ*

Die vorangegangenen Experimente zeigten, daß die Kombination von Ultraschallexposition und Plasmid-DNA-beladenen Microbubbles die Genexpression effektiv steigert. Es stellte sich nun die Frage, inwiefern sich Änderungen der Plasmid-DNA-Konzentration und der Perfusionsrate auf die Transfektionseffizienz auswirken.

Um dies zu untersuchen, wurden in einer ersten Versuchsreihe die Koronararteriensegmente gemäß 2.3.3. bei einer konstanten Perfusionsrate von 2ml/min mit unterschiedlichen Konzentrationen (0.1 μ g, 1.0 μ g, 2.0 μ g und 10.0 μ g) an pcDNA-LacZ pro ml Microbubble-Suspension transfiziert. Dabei wurde mit 0.1 μ g pcDNA-LacZ/ml eine niedrige Ausgangskonzentration gewählt, um einen Verdünnungseffekt zu imitieren und mögliche Farbintensitätsunterschiede nach β -Galaktosidase-Färbung besser detektieren zu können. In einer zweiten Versuchsreihe erfolgte die Transfektion der Koronararteriensegmente mit einer konstanten Konzentration von 2 μ g pcDNA-LacZ/ml Microbubble-Suspension entweder ohne Perfusion unter statischen Bedingungen oder mit Perfusion bei einer Perfusionsrate von 2ml/min bzw. 10ml/min. Nach Transfektion wurden die Gefäßsegmente mit X-Gal angefärbt (s. 2.5.), mit einer Digitalkamera fotografiert und histologisch aufgearbeitet. Zur Quantifizierung der Expression rekombinanter β -Galaktosidase wurde aus dem ultraschall-

exponierten Bereich der transfizierten Koronararteriensegmente gemäß 2.8.1. Proteinextrakt isoliert und die β -Galaktosidase-Aktivität gemessen (s. 2.4.). Wie Abbildung 3.6. A zeigt, führt die Transfektion unter statischen Bedingungen zu einer deutlichen Blaufärbung im ultraschall-exponierten Sektor. Die Genexpression konnte unter Flußbedingungen bei einer Perfusionsrate von 2ml/min noch gesteigert werden. Eine weitere Steigerung der Perfusionsrate (10ml/min) resultierte jedoch in einer verminderten β -Galaktosidase-Aktivität (s. Abb. 3.6. B). Die geringere Transfektionseffizienz bei 10ml/min konnte durch Steigerung der USE von 5s auf 30s kompensiert werden (s. Abb. 3.6. B). Wie Abbildung 3.6. C verdeutlicht, konnte bei konstanter Perfusionsrate und gleicher Ultraschallexpositionszeit durch Erhöhung der Konzentration an pcDNA-LacZ-beladenen Microbubble-Vektoren die Expression rekombinanter β -Galaktosidase gesteigert werden. Die obere Digitalaufnahme in Abb. 3.6. A zeigt ein Koronararteriensegment, das mit 0.1 μ g pcDNA-LacZ/ml transfiziert wurde und nur dezent blau angefärbt ist. Im Vergleich dazu führte die Transfektion mit 2.0 μ g pcDNA-LacZ/ml zu einer intensiven Blaufärbung im Bereich der Ultraschallexposition (s. Abb.3.6. A, in der Mitte).

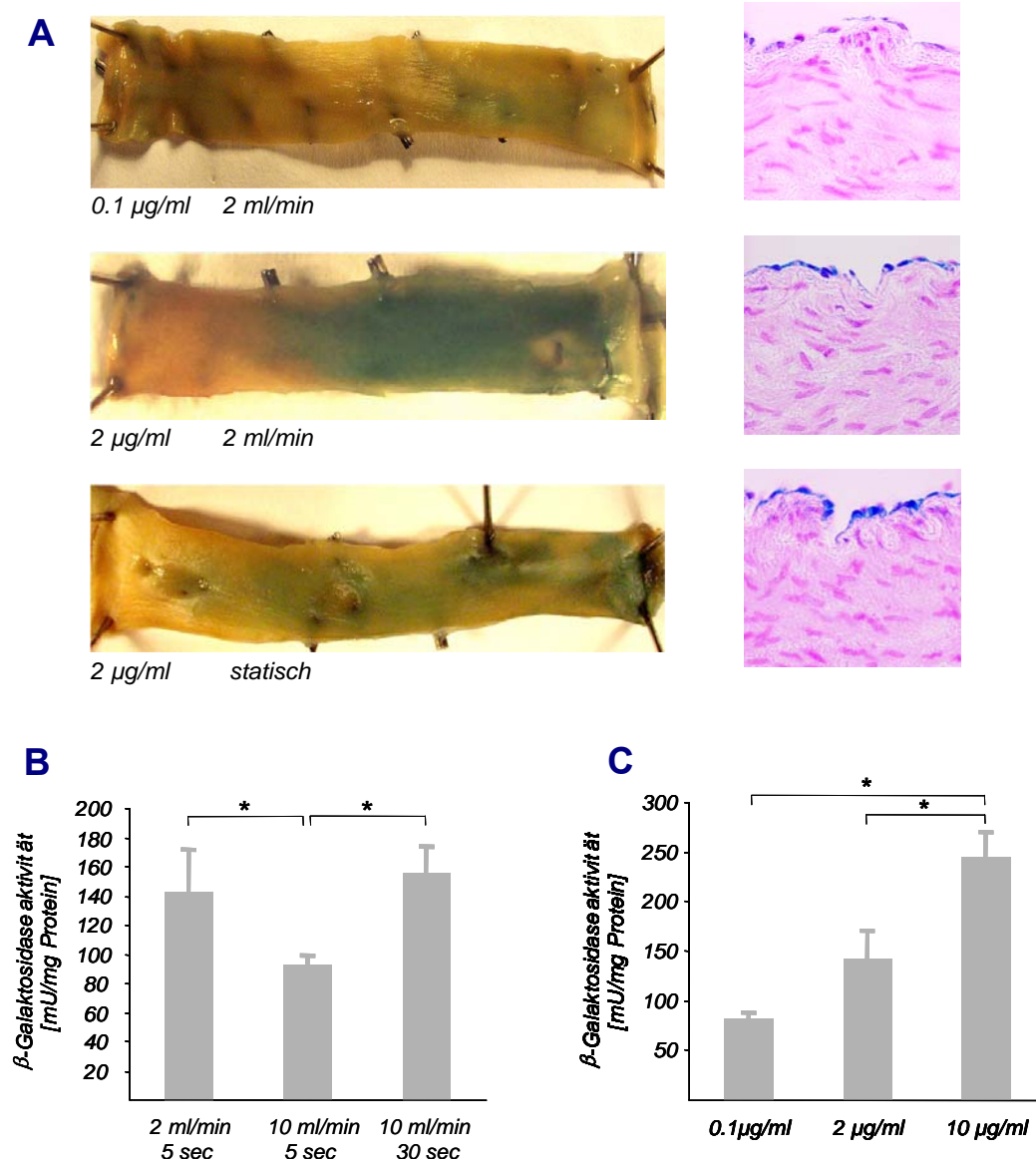


Abb. 3.6.: Expression rekombinanter β -Galaktosidase zeigt Konzentrations- und Perfusionsabhängigkeit

Die UIMD-Transfektion der Koronararterien erfolgte entweder bei einer konstanten Perfusionsrate von 2 ml/min und unterschiedlichen Konzentrationen an pcDNA-LacZ/ml Microbubble-Suspension oder mit einer konstanten Konzentration von 2 µg pcDNA-LacZ/ml Microbubble-Suspension sowohl unter statischen Bedingungen ohne Perfusion als auch bei Perfusionsraten von 2 ml/min und 10 ml/min mit einer Ultraschallexpositionszeit von 5 s oder 30 s.

- A.** Repräsentative Digitalaufnahmen und histologische Schnitte unterschiedlich transfizierter Koronararteriensegmente nach β -Galaktosidase-Färbung (n=3-11).
- B.** Effekt der Perfusionsrate auf die Expression von β -Galaktosidase [USE = 5 oder 30 s, 1.2 MI, 2.2/ 4.4 MHz, 173 fps; Cp = 2 µg/ml]. Nach Proteinisolation wurde mit Hilfe eines β -Gal-Assays die Aktivität der β -Galaktosidase bestimmt (Mittelwerte \pm SEM; n = 3-11; *p < 0.05).
- C.** Korrelation zwischen der Plasmid-DNA-Konzentration und der β -Galaktosidase-Expression [USE = 5 s, 1.2 MI, 2.2/ 4.4 MHz, 173 fps; PR = 2 ml/min]. Aktivität der β -Galaktosidase im Proteinhomogenisat (Mittelwerte \pm SEM; n = 3-6; *p < 0.05).

Eine weitere Versuchsreihe ergab, daß bei Transfektion mit einer konstanten Perfusionsrate von 2ml/min und niedriger Plasmid-DNA-Konzentration auch durch längere Ultraschallexpositionen von 30s bzw. 60s die Genexpression gesteigert werden kann [1.2MI, 2.2/4.4MHz, 173fps; PR= 2ml/min; C_p= 0.1µg/ml] (Daten nicht gezeigt).

3.2.4. Messung der Endothelfunktion nach Gentransfektion mit der UIMD-Methode

Wie die Histologie in Abbildung 3.4. zeigt, verursacht die Ultraschallexposition von Koronararteriensegmenten in Anwesenheit von pcDNA-beladenen Microbubble-Vektoren keine mikroskopisch erkennbaren Endothelläsionen. Um auch zu untersuchen, ob ultraschall-induzierte Destruktion von Microbubble-Vektoren zu einer funktionellen Beeinträchtigung des Endothels führt, wurden ultraschall-exponierte und nicht-exponierte Gefäßsegmente mit Bradykinin auf rezeptor-vermittelte und somit endothelabhängige Vasorelaxation überprüft.

Dazu erfolgte die Transfektion entweder mit oder ohne Ultraschall mit pcDNA-beladenen Microbubble-Vektoren bei einer Perfusionsrate von 2ml/min. Anschließend wurden aus den Gefäßsegmenten 4 mm-breite Ringe herausgeschnitten und diese, wie unter 2.6.2. beschrieben, sukzessive mit Bradykinin steigender Konzentration relaxiert. Die Konzentrations-Relaxationskurve in Abbildung 3.7. zeigt, daß sich ultraschall-exponierte und nicht-exponierte Gefäßsegmente in ihrem vasoreaktiven Verhalten nicht signifikant unterscheiden (pD₂ [-log EC₅₀]: 9.87 ± 1.35 vs 9.28 ± 0.07 ; n=4; p=0.6778). Das Inset in Abbildung 3.7. repräsentiert als Positivkontrolle den physiologischen, sigmoiden Kurvenverlauf eines nichtbehandelten Koronargefäßes.

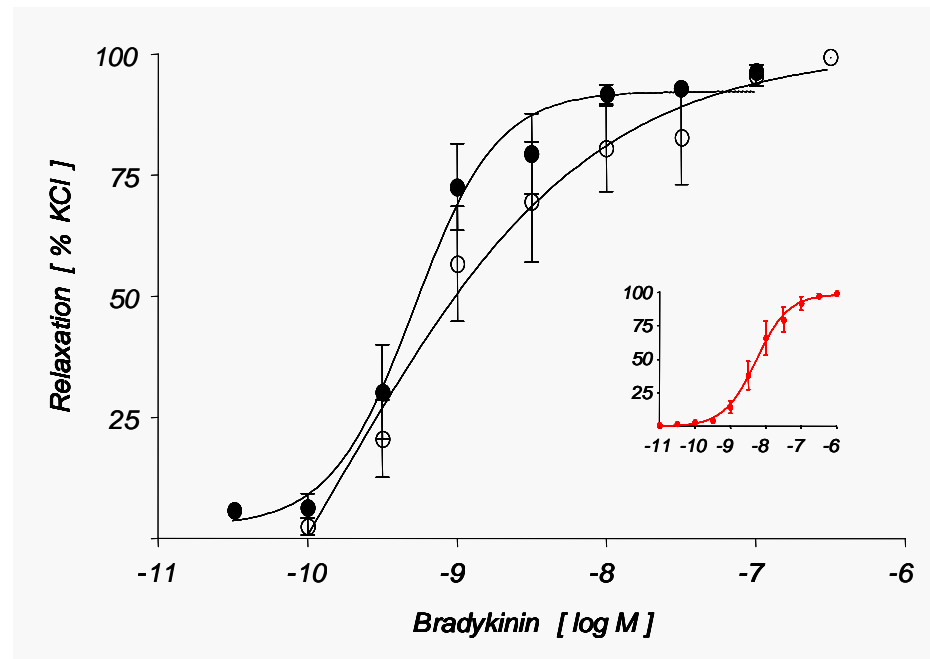


Abb. 3.7.: Effekt der ultraschall-induzierten Destruktion von Microbubble-Vektoren auf die endothelabhängige Vasorelaxation

Koronararteriensegmente wurden mit pcDNA-beladenen Microbubbles mit (●) oder ohne (○) USE bei einer Perfusionsrate von 2ml/min transfiziert [USE = 5s, 1.2 MI, 2.2/4.4 MHz, 173 fps; $C_p = 2 \mu\text{g/ml}$] und für 18h mit 2% FCS-haltigem MEM perfundiert. Anschließend wurden die Gefäßringe nach repetitiver Gabe K^+ -reicher Lösung (80mM) ausgewaschen, mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($1 \mu\text{M}$) vorkontrahiert und sukzessive mit steigenden Konzentrationen an Bradykinin (10^{-11} - 10^{-5} mol/l) relaxiert. Anhand der Registrierung der isometrischen Kraftänderungen über die Zeit (s. Abb. 2.5.) wurden die relaxierenden Antworten nach jeder titrierten Bradykininkonzentration ausgemessen und als Prozent der maximalen KCl-induzierten Vorkontraktion graphisch gegen die Bradykininkonzentration aufgetragen (Mittelwerte \pm SEM; $n=8$).

3.3. Gentransfektion durch ultraschall-induzierte Destruktion von eNOSmt-Plasmid-DNA-beladenen Microbubble-Vektoren

Wie die Experimente bisher zeigen konnten, führt die Exposition von Koronararterien mit hochenergetischem Ultraschall [USE = 5 s, 1.2 MI, 2.2/ 4.4 MHz, 173 fps] unter Perfusion mit pcDNA-LacZ-beladenen Microbubble-Vektoren zu einer erfolgreichen Gentransfektion der Gefäßwand, die unter den gegebenen experimentellen Bedingungen bei einer Plasmidkonzentration von $2 \mu\text{g/ml}$ Microbubble-Suspension und einer Perfusionsrate von 2ml/min sehr effektiv ist. Es sollte nun untersucht werden, ob sich diese Methode für einen vaskulären Gentransfer von endothelialer NO-Synthase eignet.

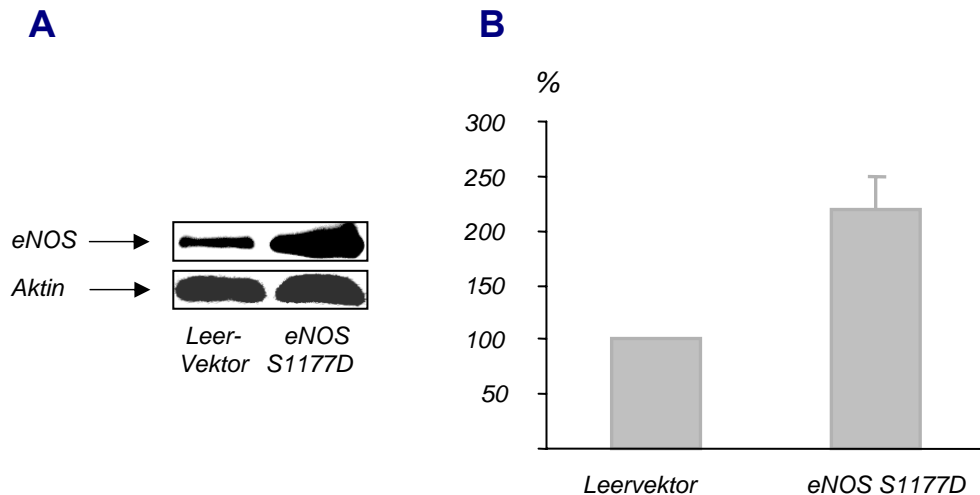


Abb. 3.8.: UIMD-Transfektion mit pcDNA-eNOSmt führt zu erhöhter Expression von endothelialer NO-Synthase in der Gefäßwand

Koronararteriensegmente wurden mit 2µg pcDNA-eNOSmt bzw. pcDNA-vector/ml Microbubble-Suspension bei einer Perfusionsrate von 2ml/min transfiziert [USE = 5s, 1.2 MI, 2.2/ 4.4 MHz, 173 fps] und anschließend für 18h mit 2% FCS-haltigem MEM perfundiert. Aus dem ultraschall-exponierten Sektor der transfizierten Gefäß-segmente wurde Proteinextrakt isoliert und im Westernblot die Expression von endothelialer NO-Synthase mittels eines anti-eNOS-Antikörpers detektiert. Zum Nachweis der Gleichladung wurde der Westernblot mit einem Aktin-Antikörper entwickelt (**A**). Die Westernblots wurden densitometrisch ausgewertet und die Ergebnisse als Prozent der Kontrolle graphisch dargestellt (**B**) (Mittelwerte ± SEM; n = 4).

In den folgenden Experimenten wurden demnach die Koronararteriensegmente gemäß 2.3.3. mit einer Perfusionsrate von 2ml/min und einer Konzentration von 2µg pcDNA/ml Microbubble-Suspension transfiziert. Perfundiert wurde mit octafluorpropanhaltigen Microbubbles, die entweder mit Kontrollplasmid oder mit einem Plasmid, das für ein phosphomimetisches eNOS-Konstrukt kodiert (pcDNA-eNOSmt), beladen waren (s. Kap. 4.5.).

3.3.1. Nachweis der Genexpression nach UIMD-Transfektion mit pcDNA-eNOSmt

Um nachweisen zu können, daß nach UIMD-Transfektion der Koronararterien mit dem phosphomimetischen eNOS-Konstrukt eNOS-Protein in der Gefäßwand exprimiert wird, wurde aus dem ultraschall-exponierten Sektor gemäß 2.8.1. Proteinextrakt isoliert und die endotheliale NO-Synthase im Westernblot mittels eines spezifischen anti-eNOS-Antikörpers detektiert. Anschließend wurden die Westernblots eingescannt und zur Quantifizierung der eNOS-Expression densitometrisch ausgewertet.

Wie der Westernblot in Abbildung 3.8. A zeigt, kommt es nach Transfektion der Koronararterien mit dem phosphomimetischen eNOS-Konstrukt zu einer eindeutig erhöhten Expression von eNOS im Vergleich zur Transfektion mit dem Kontrollvektor.

Um die Ergebnisse zu bestätigen und definitiv zu beweisen, daß die höhere eNOS-Expression Folge der Transfektion mit dem phosphomimetischen eNOS-Konstrukt ist, wurde im Westernblot die myc-his-markierte phosphomimetische eNOS mittels eines spezifischen anti-myc-Antikörpers detektiert (s. Abb. 3.9.). Als Positivkontrolle diente Proteinextrakt von Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen (*HUVEC*), die mit myc-his-markierten eNOS-Plasmiden transfiziert wurden.

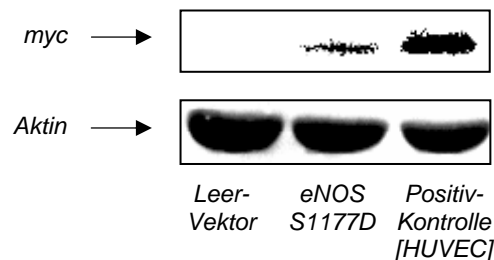


Abb. 3.9.: Qualitativer Nachweis der Expression rekombinanter eNOS nach UIMD-Transfektion mit pcDNA-eNOSmt

Nach Transfektion der Koronararteriensegmente und Proteinisolation aus dem ultraschall-exponierten Sektor wurde die Expression der myc-his-getaggten phosphomimetischen eNOS im Westernblot mittels eines spezifischen anti-myc-Antikörpers detektiert. Die rechte Bande zeigt eine Positivkontrolle aus Proteinextrakt von pcDNA-eNOSmt-transfizierten HUVEC. Zum Nachweis der Ladungsgleichheit wurde der Westernblot mit einem Aktin-Antikörper entwickelt (n = 3).

3.3.2. Effekt der UIMD-Transfektion mit pcDNA-eNOSmt auf die Vasoreaktivität

Nachdem mittels Westernblot-Analyse die Expression rekombinanter eNOS in der Gefäßwand nachgewiesen werden konnte, stellte sich nun die Frage, ob sich die erhöhte eNOS-Expression funktionell meßbar auf den Gefäßtonus auswirkt.

In einer ersten Versuchsreihe wurden die Koronararterien mit eNOS-Wildtyp-Plasmid (pcDNA-eNOS*wt*) transfiziert. Im Westernblot konnte zwar rekombinantes eNOS-Protein in etwa gleichem Ausmaß wie nach Transfektion mit dem eNOS*mt*-Plasmid detektiert werden, jedoch zeigte die Konzentrations-Relaxationskurve nach Gabe von Bradykinin keine signifikante Verbesserung der

Vasorelaxation im Vergleich zu vector-transfizierten Gefäßen (Daten nicht gezeigt). Mögliche Erklärungen für diese Ergebnisse werden in Kapitel 4.5. ausführlich diskutiert. Eingesetzt wurde demnach als Plasmid das phosphomimetische eNOS-Konstrukt, wobei zur Messung der Endothelfunktion eine spezielle Methode angewandt wurde, mit der untersucht werden kann, in welchem Ausmaß die transfizierten Koronararterien auf einen vasokonstriktorisches Stimulus mit einer isometrisch gemessenen Kontraktion reagieren (s. Kap. 4.5.).

Nach UIMD-Transfektion der Koronarsegmente wurden aus dem ultraschall-exponierten Sektor Gefäßringe herausgeschnitten und gemäß 2.6.1. der isometrischen Kraftmessung unterzogen. Um zunächst die funktionelle Endothelintegrität zu überprüfen, wurden die mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ vorkontrahierten Gefäßringe mit Bradykinin auf Vasorelaxation getestet. Anschließend wurden die Gefäßringe ausgewaschen und mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ leicht vorkontrahiert, bevor durch die Applikation des eNOS-Inhibitors LNMA eine weitere Tonuszunahme induziert wurde. Die isometrischen Kraftänderungen über die Zeit wurden aufgezeichnet (s. Abb. 2.4.) und anhand der graphischen Registrierung die vasokonstriktorische Antwort nach Gabe von $\text{PGF}_{2\alpha}$ relativ zur maximalen KCl-induzierten Vorkontraktion, sowie die vasokonstriktorische Antwort nach Gabe von LNMA relativ zur $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induzierten Vorkontraktion ausgewertet. Wie Abbildung 3.10. A zeigt, reagieren die pcDNA-eNOSmt-transfizierten Koronararterien auf $\text{PGF}_{2\alpha}$ mit einer signifikant verminderten Zunahme des Vasotonus im Vergleich zu vector-transfizierten Gefäßen. Um zu zeigen, daß die verminderte Tonuszunahme über eine gesteigerte NO-Synthese vermittelt wird, wurde mit LNMA die eNOS inhibiert mit dem Ergebnis, daß bei eNOSmt-transfizierten Koronararterien der Effekt durch LNMA stärker antagonisiert wird, was sich in einer signifikant stärkeren Vasokonstriktion äußert (s. Abb. 3.10. B).

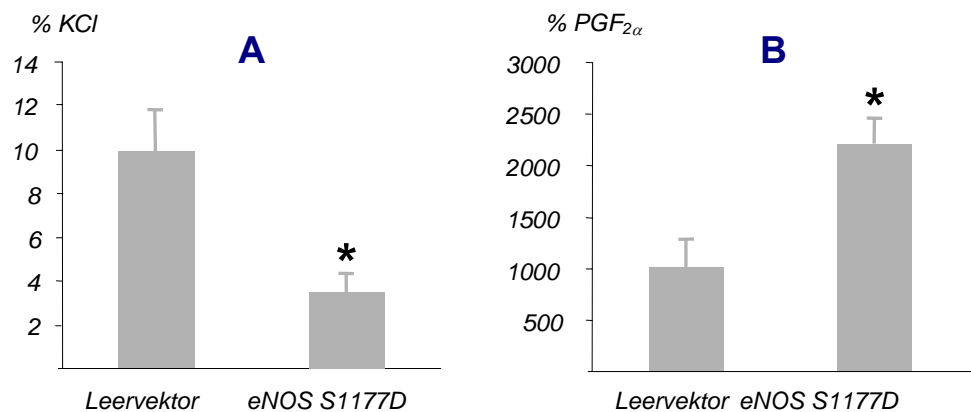


Abb. 3.10.: pcDNA3.1-eNOSmt-transfizierte Koronararterien zeigen eine verminderte Vasokonstriktion nach PGF_{2α}

Koronararterienabschnitte wurden mit 2 µg pcDNA-eNOSmt bzw. pcDNA-vector/ml Microbubble-Suspension bei einer Perfusionsrate von 2 ml/min transfiziert [USE = 5s, 1.2 MI, 2.2/ 4.4 MHz, 173 fps] und anschließend für 18 h mit 2% FCS-haltigem MEM perfundiert. Aus dem ultraschall-exponierten Sektor wurden 4mm-breite Ringe herausgeschnitten und in einem Organbad an ein spezielles Kraftmeßgerät eingehängt. Die Gefäßringe wurden zunächst mit Bradykinin auf ihre Endothelintegrität überprüft, ausgewaschen und nach Erreichen des Basaltonus mit PGF_{2α} (0.1 µM) leicht vorkontrahiert. Anschließend wurde mit LNMA (300 µM) die eNOS inhibiert. Mit einem an das Kraftmeßgerät angeschlossenen Schreiber wurden die isometrischen Kraftänderungen über die Zeit aufgezeichnet und anhand der graphischen Registrierung ausgewertet.

- A.** Effekt von PGF_{2α} auf die Vorkontraktion nach passiver Vordehnung Die vasokonstriktorisches Antwort nach Gabe von PGF_{2α} wurde ermittelt und als Prozent der maximalen KCl-induzierten Vorkontraktion dargestellt (Mittelwerte ± SEM; n¹) = 8; *p<0.05 versus vector).
- B.** Effekt von LNMA auf die Vasokonstriktion nach Gabe von PGF_{2α}. Die vasokonstriktorisches Antwort nach Gabe von LNMA wurde ermittelt und als Prozent der PGF_{2α}-induzierten Vorkontraktion dargestellt (Mittelwerte ± SEM; n¹) = 8; *p<0.05 versus vector).

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß die ultraschall-induzierte Transfektion von Koronararterien mit pcDNA-eNOSmt-beladenen Microbubble-Vektoren nicht nur zu einer gesteigerten eNOS-Expression in der Gefäßwand führt, sondern auch mit einer basal erhöhten eNOS-Aktivität und somit gesteigerten NO-Synthese einhergeht, die zu einer eNOS-abhängigen Reduktion des Vasotonus führt.

¹⁾ Die angegebenen n-Zahlen beziehen sich auf die Summe der einzeln gemessenen Gefäßringe. Da aus den transfizierten Gefäßsegmenten jeweils 2 Ringe herausgeschnitten wurden, beträgt die Anzahl separat durchgeführter und voneinander unabhängiger Experimente vier. Die Ergebnisse sind nach Mittelwertbestimmung beider Werte eines unabhängigen Experiments ebenfalls signifikant (Daten nicht gezeigt; n = 4).

4. Diskussion

4.1. *Herstellung von Albumin-Microbubbles*

In der vorliegenden Arbeit wurden die Microbubbles in Anlehnung an die von Reisner et al. (Reisner 1988, 89) etablierte Methode hergestellt. Dabei kommt es durch elektromechanische Sonifikation einer 5%igen Humanalbuminlösung unter Einstrom eines Gases zur Bildung kleiner gashaltiger Mikrosphären (s. Abb. 3.1. A). Durch die Einführung der Sonifikation zur Herstellung von Ultraschallkontrastmitteln (Feinstein 1986) ist es möglich geworden, standardisiert kleine und uniforme Microbubbles mit einer etwa 15nm dünnen Albuminschale herzustellen (Hellebust 1993). Die Gasbläschen werden durch die umgebende dünne Proteinschicht stabilisiert, wobei neben hydrophoben Wechselwirkungen auch nicht-kovalente Bindungen zwischen den Albuminmolekülen für die Stabilität verantwortlich sind (Hellebust 1993). Es konnte gezeigt werden, daß in der Proteinschale bedeutende Mengen an aggregierten Albuminmolekülen enthalten sind, die sich durch Reduktion von Disulfidbrücken wieder in Monomere spalten lassen (Hellebust 1993), was darauf hinweist, daß intermolekulare Disulfidbrücken an der Stabilisierung der Microbubbles beteiligt sind und der Prozeß reversibel ist. Durch die Sonifikation wird das Albumin physikalisch erhitzt und denaturiert unter Bildung kleiner Gaseinschlüsse (Vandenberg 1994). Geringe Modifikationen bei der Herstellung können jedoch schnell durch zu hohe Temperaturen im System zu einer irreversiblen Denaturierung des Albumins führen, was mit Eiweißverklumpungen einhergeht und somit die Herstellung homogener Microbubbles stark beeinträchtigt. Bei der standardisierten Herstellung der Albumin-Microbubbles (s. 2.1.1.) ergaben Temperaturmessungen direkt nach der Sonifikation einen mittleren Wert von 55°C, Temperaturen über 60°C führten in der Regel zur irreversiblen Denaturierung des Albumins. Dies ist eine interessante Beobachtung, zumal Chen et al. die Albumin-Microbubbles durch Sonifikation bei Temperaturen von 75°C herstellten. Allerdings wurde nur 1%iges Humanalbumin verwendet (Chen 2000).

4.1.1. *Einfluß des Gases auf die Stabilität der Microbubbles*

Reisner et al. stellten mit der Methode der Sonifikation luftgefüllte Albumin-Microbubbles mit einem mittleren Bubble-Durchmesser von $5 \pm 3 \mu\text{m}$ her (Reisner 1989), vergleichbar mit den Werten von Albutex[®], einem der ersten klinischen Vertreter luftgefüllter ($\text{N}_2=77.1\%$, $\text{O}_2=20.8\%$) Ultraschallkontrastmittel. Ein Hauptproblem dieser kleinen lufthaltigen Microbubbles ist jedoch die kurze Aktionsdauer aufgrund ihrer Instabilität, was sich sowohl in der Kontrast-

echokardiographie als auch beim Einsatz von Microbubbles als Gentransfervektoren nachteilig auswirkt.

Neben physikochemischen Eigenschaften der Bubbleschale sind mit der Diffusionskonstante und des Löslichkeitskoeffizienten im Blut zwei wichtige physikalische Gaseigenschaften an der Stabilität von Microbubbles beteiligt. Werden lufthaltige Microbubbles intravenös injiziert, besteht eine direkte Korrelation zwischen der Diffusionskonstante des enthaltenden Gases und der Radiusverkleinerung der Microbubbles (de Jong 1993b). Nach dem Gesetz von Graham ist die Diffusionsrate D_r eines Gases umgekehrt proportional zur Quadratwurzel dessen Molekulargewichts M (Nebergall 1976). Da Stickstoff und Sauerstoff niedrige Molekulargewichte haben (s. Tab. 4.1.), diffundieren sie leicht entlang des Konzentrationsgradienten aus den Microbubbles ins Blut, zudem sind diese Gase aufgrund ihres relativ hohen Löslichkeitskoeffizienten α in Abhängigkeit des Partialdrucks im Blut gut löslich. Je größer die Diffusionsrate und je höher die Löslichkeit eines Gases in Blut ist, desto schneller entweicht das Gas (de Vries 1982), was zu einer Verkleinerung und Instabilität der Bubbles sowie zu einer exponentiellen Abnahme des backscatters ($\sim r^6$) führt (de Jong 1991, Kaul 1996).

Gas	Symbol	α	M
Stickstoff	N ₂	0.012	28
Sauerstoff	O ₂	0.024	32
Octafluorpropan	C ₃ F ₈	~ 0.001	188

M (Molekulargewicht [g/mol]); α (Löslichkeitskoeffizient [ml Gas/ ml Blut * atm]; T=37°C)

Tab. 4.1.: Löslichkeitskoeffizienten und Molekulargewichte verschiedener Gase

Neuere Ultraschallkontrastmittel der zweiten Generation enthalten an Stelle von Luft perfluorierte Kohlenwasserstoffgase. Dies basiert auf der Hypothese, daß die Verwendung eines hochmolekularen, zugleich schlecht löslichen und grenzflächenaktiven Gases die Stabilität von Microbubbles erhöht (Mattrey 1994). Ein für die klinische Anwendung zugelassenes Ultraschallkontrastmittel der zweiten Generation ist Optison®, das aus perfluorpropanhaltigen Albumin-Microbubbles besteht, die in einer 1%igen Humanalbuminlösung suspendiert sind (Optison Med Info 1999). Perfluorierte (per = ringsum, völlig) Alkane sind durch die mit der Länge der Kohlenstoffkette korrelierende Anzahl an Fluoratomen entsprechend stark hydrophob und somit sehr schlecht in Blut löslich. Aufgrund ihrer

hydrophoben Eigenschaft sind diese organischen Verbindungen grenzflächenaktiv, d.h. sie können sich an Grenzflächen anlagern und die Oberflächen-/Grenzflächenspannung (v.a. des H_2O) herabsetzen. Dies spielt bei den relativ kleinen Albumin-Microbubbles eine wichtige Rolle, denn je kleiner ein Bubble ist, desto größer ist die an seiner Oberfläche wirkende Spannung, die mit höheren intrakavitären Gasdrücken im Bubble assoziiert ist. Das eingeschlossene Gas hat somit die Tendenz, aus dem Bubble zu entweichen (Weyman 1994).

Da Perfluorpropan im Vergleich zu N_2 und O_2 einen kleineren Löslichkeitskoeffizienten und ein wesentlich größeres Molekulargewicht besitzt (s. Tab. 4.1.), kommt es zu einer geringeren Diffusion des Gases entlang des Konzentrationsgradienten aus den Microbubbles (de Vries 1982). Zudem sind perfluorierte Alkane ($\text{C}_n\text{F}_{2n+2}$) aufgrund der sehr hohen C-F-Bindungsenergien ($\sim 448\text{J}$ - 506J) ausgesprochen reaktionsträge und zeigen bei Reaktionen eine weitgehende chemische und thermische Resistenz. 1ml Optison[®]-Lösung enthält 0.22mg Perfluorpropan, das eine pulmonale Halbwertszeit von 1.3 min hat und in weniger als 10 min nahezu vollständig abgebaut wird (Optison Med Info). Die Sicherheit und Verträglichkeit des perfluorpropanhaltigen Ultraschallkontrastmittels Optison[®] sowie dessen Überlegenheit gegenüber Albunex[®] konnten in klinischen Studien der Phase III nachgewiesen werden (Cohen 1998).

Wie unter 2.1.1. beschrieben, wurden zur Etablierung der Methode und zur morphologischen Analyse zunächst lufthaltige Microbubbles hergestellt. Es konnte jedoch beobachtet werden, daß nach Herstellung und Stehenlassen der Bubble-Lösung die Anzahl an lufthaltigen Microbubbles in wenigen Minuten rasch abnimmt. Perfluorpropanhaltige Bubbles blieben dagegen über mehrere Tage bei $+4^\circ\text{C}$ stabil suspendiert.

Für die folgenden Gentransferexperimente wurden octafluorpropanhaltige Microbubbles aufgrund ihrer höheren Stabilität und der wesentlich besseren DNA-Bindungseigenschaften im Gegensatz zu lufthaltigen Bubbles (Porter 1996) eingesetzt. Der mittlere Durchmesser der octafluorpropanhaltigen Microbubbles beträgt $3.0 \pm 1.5 \mu\text{m}$ und entspricht den für Optison[®] von der Firma Mallinckrodt angegebenen Werten ($2.0 - 4.5 \mu\text{m}$) (Optison Med Info). Die Größenverteilung von Albumin-Microbubbles spielt eine wichtige Rolle beim diagnostischen und therapeutischen Einsatz von Microbubbles in vivo. Stabile Microbubbles $< 5 \mu\text{m}$ können nach i.v.-Injektion die Lungenstrombahn passieren und gelangen über den linken Ventrikel in den großen Kreislauf (Meltzer 1980, Feinstein 1990). Zudem konnte gezeigt werden, daß Microbubbles $< 4 \mu\text{m}$ besser ultraschall-induziert zerstört werden können (Porter 1997), was Auswirkungen auf das drug-targeting mit Microbubble-Carrier und der UIMD-

Methode haben könnte (s. Kap. 1.3.1.3.). Die Anzahl der Microbubbles pro ml beschallter Albuminlösung ist mit $2.18 \pm 0.46 \times 10^8$ etwa um den Faktor drei niedriger als bei Optison®. Auch morphologisch sind die octafluorpropanhaltigen Gassphären (s. Abb. 3.1.) vergleichbar mit den Optison®-Microbubbles (Optison Med Info). Da die Ergebnisse der in dieser Arbeit etablierten Methode gut mit den entsprechenden Werten von Optison® korrelieren, können auf die gut untersuchten Eigenschaften des in der Klinik etablierten Echokontrastmittels Rückschlüsse gezogen werden.

4.2. Herstellung Plasmid-DNA-beladener Microbubble-Vektoren

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß nach Herstellung pcDNA-beladener Microbubbles durch elektromechanische Sonifikation die Plasmid-DNA spezifisch in der Albuminschale der octafluorpropanhaltigen Microbubbles integriert ist (s. Kap. 3.1.3.). Dies eröffnet die exzellente Möglichkeit, Ultraschallkontrastmittel als Genvektoren einzusetzen, um Plasmid-DNA gezielt unter Monitoring mit niedrig-energetischem Ultraschall an den Ort des Interesses zu bringen.

4.2.1. Bedeutung der spezifischen Bindung von DNA an Microbubbles

Bei den meisten in vitro und in vivo Experimenten zum ultraschall-unterstützten Gentransfer mit Ultraschallkontrastmitteln wurde bei der Herstellung eine Microbubble-Suspension (meist Optison® oder PESDA) mit viralen Vektoren (Shohet 2000, Beeri 2002) oder Plasmid-DNA (Bao 1997, Greenleaf 1998, Chen 2001, Christiansen 2001, Vannan 2002, Taniyama 2002 a, b) inkubiert. Dabei blieb in der Regel ungeklärt, wieviel DNA wirklich an die Microbubbles gebunden bleibt, vor allem wenn die so hergestellte Suspension zur Injektion selbst oder in der Zirkulation nach intravasaler Gabe verdünnt wird. In vivo an Ratten führte zwar die ultraschall-unterstützte Transfektion mit einer Mischung aus Bubblesuspension und Plasmid-DNA zu einer erfolgreichen myokardialen Genexpression, jedoch zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren (Chen 2001). Nach Injektion der Microbubble-Plasmid-DNA-Mischung dissoziiert möglicherweise die Plasmid-DNA von den Microbubbles und im Bereich der ultraschall-induzierten Destruktion kommt es aufgrund einer unsicheren Kolokalisation von Bubbles und genetischem Material zu den stark variierenden Outcomes.

Bei der Gentransfektion spielen Ultraschallkontrastmittel nicht nur aufgrund der akustisch induzierbaren Bioeffekte eine wichtige Rolle, sondern sie sollen auch als Gen-tragende Carrier (Vektoren) fungieren, um das genetische Material gezielt an den Ort des Interesses zu bringen. So kann nicht nur die Verfügbarkeit

des genetischen Materials im Zielorgan verbessert, sondern auch die Dosis reduziert und Systemeffekte minimiert werden (drug targeting, s. Kap. 1.3.).

Dies setzt eine spezifische Bindung der DNA an die Albuminschale oder eine Internalisierung der DNA in das Microbubble voraus. Es ist bekannt, daß hitze-unbehandeltes natives Albumin eine hohe Affinität zu synthetischen Antisense-Oligonukleotiden besitzt (Srinivasan 1995). Diese Bindungsaffinität von Albumin bleibt nach elektromechanischer Sonifikation zur Herstellung von perfluorcarbonhaltigen Microbubbles (PESDA = perfluorocarbon-exposed sonicated dextrose albumin) erhalten (Porter 1996).

Wie Wyber et al. zeigen konnten, können Zellen erfolgreich mit Plasmid-DNA unter elektromechanischer Sonifikation transfiziert werden, wobei die Zellsuspensionen für 30 Sekunden mit einem 20kHz-Sonifier beschallt wurden. Auch die Effekte der Sonifikation auf die Integrität der Plasmid-DNA wurden untersucht und es konnten keine strukturellen Schäden an der Plasmid-DNA festgestellt werden (Wyber 1997).

Die unter 2.1. beschriebene Herstellung der pcDNA-beladenen Microbubbles wurde unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen in der Annahme durchgeführt, so keine strukturellen DNA-Schäden zu induzieren. Die funktionelle Integrität der Plasmide konnte in den folgenden Experimenten durch erfolgreiche endotheliale Genexpression nach Transfektion von β -Galaktosidase-kodierenden Plasmiden nachgewiesen werden, was auch daraufhin deutet, daß die Zerstörung der Microbubble-Carrier durch hochenergetischen Ultraschall (MI 1.2, 2.2/4.4MHz, 173fps) zu keiner funktionellen Schädigung der Plasmid-DNA führt. Porter et al. konnten sowohl in vitro als auch in vivo zeigen, daß durch Anwendung von diagnostischem Ultraschall (2.0MHz, 1.2MPa, 30fps) DNA-konjugierte PESDA-Microbubbles zerstört und die Antisense-Oligonukleotide ohne strukturelle Schädigung freigesetzt werden (Porter 1996).

In einer erst kürzlich veröffentlichten Publikation wurde gezeigt, daß bei der analog zu in dieser Arbeit entwickelten Methode zur Herstellung Plasmid-DNA-beladener Microbubbles die Struktur und Funktion der Plasmid-DNA erhalten bleibt, sowohl als integrierter Bestandteil der Albuminschale als auch nach Freisetzung durch ultraschall-induzierte Destruktion der Plasmid-DNA-beladenen Microbubbles (Frenkel 2002). Zudem konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, daß die Transfektion nach UIMD bei Anwendung von Plasmid-DNA-beladenen Microbubbles erfolgreicher ist als bei Anwendung von Microbubbles, die nur mit Plasmid-DNA inkubiert wurden. Dies läßt darauf schließen, daß die DNA-Bindung während der Bubble-Synthese einen positiven Effekt auf die Effizienz des

Gentransfers hat. Vermutet wird neben der direkten Anwesenheit des genetischen Materials am Ort der durch die Microbubble-Destruktion induzierten Bioeffekte auch ein möglicher Schutz vor DNAsen durch die Integration der Plasmid-DNA in die Microbubble-Schale (Frenkel 2002).

Trotz allem wird in der Literatur beschrieben, daß durch akustische Kavitation unter bestimmten Bedingungen DNA-Strangbrüche induziert werden können (Miller 1995). Kollabieren die Microbubbles bei inerter Kavitation sehr schnell, können freie Radikale und sogenannte Sonolumineszenz-Moleküle wie H_2O_2 entstehen (Riesz 1992), die DNA-Schäden und weniger wahrscheinlich auch Zellmembranschäden verursachen können (Miller 1991). Letztere werden vor allem durch die bei akustischer Kavitation entstehenden mechanischen und ballistischen Effekte auf angrenzende Membranstrukturen erklärt (Carstensen 1993).

Wie die Immunfluoreszenzanalyse der Microbubbles nach Sonifikation der mit Propidium-Iodid-markierter DNA versetzten Humanalbuminlösung zeigt, ist die DNA in die dünne Proteinschale der Microbubbles integriert (s. 3.1.3.). Interessant wäre zu wissen, wieviel DNA nach diesem Herstellungsprozeß prozentual an den Microbubbles gebunden ist. Frenkel et al. geben an, daß 17-20% der zur Sonifikation eingesetzten DNA-Menge aus den Microbubbles extrahiert werden konnte, wobei die Menge an inkorporierter DNA linear mit der zur Herstellung eingesetzten DNA-Konzentration anstieg (Frenkel 2002).

4.3. Plasmid-DNA beladene Microbubbles als Genvektoren

Der non-virale Gentransfer mit nackter Plasmid-DNA stellt zwar ein sicheres Verfahren für den vaskulären Gentransfer in die Gefäßwand dar, jedoch limitieren die nur geringen Transfektionseffizienzen einen erfolgreichen in vivo Einsatz von Plasmid-DNA.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein effizientes non-virales Gentransfersystem für den gezielten Transfer von Plasmid-DNA in die Gefäßwand entwickelt. Als Genvektoren wurden Microbubble-Plasmid-DNA-Carrier eingesetzt, die nach intravaskulärer Applikation sonographisch dargestellt und durch Erhöhung der Ultraschallenergie in einem definierten Schallsektor gezielt zerstört wurden.

4.3.1. Ex vivo Transfektion von Koronararterien durch ultraschall-induzierte Destruktion von Plasmid-DNA-beladenen Microbubbles (UIMD)

Die Experimente zur UIMD-Transfektion wurden unter kontinuierlichen Flußbedingungen durchgeführt, um ein dynamisches Perfusions-Modell zu erhalten.

Der normale koronararterielle Blutfluß beträgt etwa 4% des Herzzeitvolumens, also ungefähr 200 ml/min. Unter den experimentellen Bedingungen war es nicht möglich, ein Modell zu konstruieren, in dem der physiologische Fluß in einer Koronararterie imitiert werden konnte, zumal die freipräparierten Koronargefäße nicht mehr druckstabil myokardial eingebettet waren und über einen handelsüblichen Medikamentenperfusor nur Perfusionsraten bis maximal 10ml/min eingestellt werden konnten. Zur Evaluierung eines standardisierten dynamischen Perfusions-Modells wurde mit 2 ml/min eine niedrige Perfusionsrate festgelegt, die es ermöglichte, in weiteren Experimenten den Einfluß der Perfusion auf die Transgenexpression zu untersuchen. Vergleichbare Perfusionsgeschwindigkeiten (2.5 ml/min) wurden von Mukherjee et al. zur UIMD-Transfektion mit rekombinantem VEGF₁₆₅-Protein an Herzen von Ratten eingesetzt (Mukherjee 2000).

Die Plasmid-DNA-Konzentration bei der Herstellung der Microbubble-Vektoren betrug bei allen Experimenten 10µg pro ml Humanalbumin. Die durch Sonifikation hergestellte Microbubble-Suspension wurde mit Humanalbumin auf unterschiedliche DNA-Konzentrationen pro ml Microbubble-Suspensionen verdünnt. Demnach verhält sich die entsprechende Plasmid-DNA-Konzentration proportional zu der Anzahl an Microbubbles, was einen physiologischen Verdünnungseffekt imitiert. Das heißt also, daß bei höheren Plasmid-DNA-Konzentrationen im Perfusat auch mehr Microbubbles und somit Genvektoren enthalten sind.

Zunächst wurde ein Standardverfahren etabliert, bei dem die Koronararterien mit Microbubble-Vektoren bei einer Geschwindigkeit von 2 ml/min perfundiert und in einem definierten Sektor für 5s im harmonic imaging -Modus gescannt wurden. Die Konzentration an Plasmid-DNA betrug 2µg pro ml Microbubble-Suspension (s. Kap. 3.2.1.).

An dem in dieser Arbeit entwickelten Perfusions-Modell (s. Kap. 2.3.) zur ex vivo Transfektion von Koronararterien konnte durch ultraschall-induzierte Destruktion von Plasmid-DNA-beladenen Microbubble-Vektoren (*UIMD*) die Gefäßwand zunächst erfolgreich mit LacZ-Reporterplasmiden transfiziert werden. Rekombinante Proteinexpression von β -Galaktosidase konnte dabei vor allem in der Endothelschicht und auch sporadisch in der Adventitia nachgewiesen werden (s. Kap. 3.2.1.).

Es ist bekannt, daß nach transluminalem vaskulärem Gentransfer vor allem mit adenoviralen Vektoren regelrecht Endothelzellen und adventitielle Fibroblasten, nicht aber glatte Gefäßmuskelzellen der Media das Transgen exprimieren

(Ooboshi 1997, Mozes 1998, Aschner 1999, Lund 2000). Zur Transfektion glatter Gefäßmuskelzellen (VSMCs) müssen die Genvektoren die endothelialen oder adventitiellen Barrieren sowie das elastische und kollagene Bindegewebe der Media überwinden, während die spärliche Adventitia über Vasa vasorum leichter transfiziert werden kann (Sato 2000). Die experimentellen Befunde aus Kapitel 3.2.1. zeigen, daß beim transluminalen Gentransfer mit der UIMD-Methode die Endothelzellschicht spezifisch und mit hoher Effizienz transfiziert werden kann. Mit über 90% transfizierter Endothelzellen im Ultraschallsektor konnte eine Gentransfereffizienz erzielt werden, die mit der Effizienz adeno-viraler Vektoren bei der Transduktion von Gefäßsegmenten ex vivo vergleichbar ist. So konnten Aschner et al. zeigen, daß die Inkubation von Pulmonalarterien-segmenten mit AdCMV-LacZ bei 3×10^{10} pfu/ml für 30 Minuten zu einer homogenen Blaufärbung der Endothelschicht führt. An Endothelzellkulturen unter gleichen Bedingungen wurde eine nahezu 100%ige Transduktionseffizienz erzielt (Aschner 1999). Auch an atherosklerotisch veränderten Gefäßen konnten vergleichbare Ergebnisse beobachtet werden (Ooboshi 1997, Mozes 1998).

Die Ultraschall-unterstützte Transfektion mit Plasmid-DNA ist ein schon länger etabliertes non-virales Verfahren zur Erhöhung der Gentransfereffizienz sowohl in vitro (Fechenheimer 1987, Kim 1996, Bao 1997, Tata 1997, Wyber 1997, Lawrie 1999) als auch in vivo (Miller 1999, Huber 2000). Aber auch mit dieser physikalischen Methode zur Verstärkung non-viraler Transfektion werden bei weitem nicht die Erfolge viraler Transduktionsmethoden erreicht. So konnten bei optimaler ultraschall-unterstützter Transfektion in vitro Gentransfereffizienzen von nur 2.4% mit β -Galaktosidase (Kim 1996, Lauer 1997) und 15% mit GFP (*green fluorescent protein*) (Tata 1997, Greenleaf 1998) erzielt werden. Diese geringen Transfektionseffizienzen limitieren eine erfolgreiche in vivo Transfektion durch Sonoporation. In der Annahme, daß akustische Kavitation und deren Bioeffekte für die ultraschall-unterstützte Transfektion verantwortlich sind, kann eine Verbesserung der Performance akustischer Kavitationsereignisse die Transfektionseffizienz durch Sonoporation steigern (Kim 1996, Bao 1997, Greenleaf 1998). Wie in Kapitel 1.3.1.3. beschrieben, wird durch die Anwesenheit akustisch aktiver Microbubbles im Schallfeld die Schwellenenergie für das Auftreten akustischer Kavitation deutlich herabgesetzt und die Effizienz der ultraschall-unterstützten Transfektion mit Plasmid-DNA signifikant erhöht.

In dieser Arbeit konnte an einem dynamischen ex vivo Perfusions-Modell an Koronararterien gezeigt werden, daß die intravaskuläre Applikation von Plasmid-DNA-beladenen Microbubble-Vektoren die ultraschall-unterstützte Transfektion mit Plasmid-DNA erheblich steigert. Interessanterweise führte die

Transfektion mit nackter Plasmid-DNA bei alleiniger Ultraschallexposition ohne Microbubbles unter den experimentellen Standardbedingungen zu keiner signifikanten Erhöhung der β -Galaktosidase-Enzymaktivität (s. 3.2.2.). Vermutlich reicht die nur durch ultraschall-induzierte transiente Sonoporation unter den Perfusionsbedingungen nicht aus, um einen effektiven Transfer der Plasmid-DNA zu ermöglichen, zumal die Perfusions- und Beschallungszeit bei diesen Experimenten mit 5 Sekunden sehr kurz war und danach die Gefäßsegmente sofort mit vektorfreiem Zellmedium perfundiert wurden. Bei ultraschall-unterstützter Transfektion von Plasmid-DNA an Zellkulturen werden die Zellen mit dem im Medium befindlichen Vektor inkubiert und beschallt, wobei die Plasmid-DNA permanent vor Ort ist, während unter Perfusion die für den Gentransfer verantwortlichen Mechanismen entweder einen sofortigen Uptake des Vektors selbst oder eine Bindung des Vektors an die Zellmembran ermöglichen müssen, um einen effektiven transmembranen Transfer zu gewährleisten. Ähnliche Beobachtungen machte die Arbeitsgruppe von Taniyama et al. trotz Beschallung mit wesentlich höherer akustischer Leistung (2.5 W/cm^2). An Karotisarterien in vivo führte die ultraschall-unterstützte Transfektion mit nackter Reporterplasmid-DNA ohne Microbubbles zu keinem signifikanten Anstieg der Luciferase-Aktivität, jedoch konnte in vitro an Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen mit Ultraschall alleine ein etwa 70facher Anstieg der Luciferase-Aktivität im Vergleich zur Transfektion mit Plasmid-DNA ohne Schallexposition erzielt werden (Taniyama 2002a). Aber auch an Endothelzell-Kulturen wurde beobachtet, daß die Reportergenexpression nach Transfektion mit nackter Plasmid-DNA auch in vitro durch Ultraschall (1MHz , 0.4 W/cm^2 , 60s) nicht immer konsekutiv gesteigert werden kann (Lawrie 1999). Übereinstimmend mit zahlreichen Arbeiten (Greenleaf 1998, Lawrie 1999, Taniyama 2002 a, b) führte die Transfektion mit Plasmid-DNA ohne gleichzeitige Beschallung zu keiner nennenswerten Genexpression, was die allgemein postulierte geringe Transfektionseffizienz nackter Plasmid-DNA bestätigt (Felgner 1997).

Wie aus der Versuchsreihe in 3.2.2. hervorgeht, konnte mit der Standardtransfektionsmethode unter Perfusion mit Plasmid-DNA-beladenen Microbubble-Vektoren der ultraschall-unterstützte Gentransfer erfolgreich moduliert werden und führte zu einem 12fachen Anstieg der β -Galaktosidase-Enzymaktivität im Vergleich zu den Kontrollexperimenten ohne die Applikation akustisch aktiver Microbubbles oder ohne Beschallung der Gefäßsegmente. Vergleichbare Ergebnisse mit der UIMD-Methode erzielten Shohet et al. bei adenoviraler Transfektion mit $\text{Ad}\beta\text{-Gal}$ an Rattenherzen in vivo (10facher Anstieg der β -Gal-Aktivität vs. Kontrollen) (Shohet 2000) und Mukherjee et al. beim myokardialen

Transfer von VEGF₁₆₅-Protein (13fach höherer Uptake) (Mukherjee 2000). Myokardiale UIMD-Transfektion mit Plasmid-DNA in vivo führte zu etwa 7fach höherer Luciferase-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen (Chen 2001). Weitere Arbeitsgruppen konnten durch die UIMD-Transfektion mit anderen Reporterplasmiden auch weitaus höhere Zunahmen der Enzymaktivität messen (Greenleaf 1998, Taniyama 2002 a, b). Die teils stark variierenden Outcomes können jedoch nicht einfach verglichen werden, da die Transfektionseffizienz der UIMD-Methode erheblich von den Modalitäten der jeweiligen Experimente abhängig ist und die meisten in vitro und in vivo Versuche an verschiedenen Zell- und Organsystemen unter sehr unterschiedlichen Gentransferbedingungen vor allem in bezug auf die Ultraschallparameter und Vektoreigenschaften durchgeführt wurden. Einheitlich läßt sich aber sagen, daß mit der UIMD-Methode die Gentransfereffizienz von adenoviralen Vektoren, aber vielmehr noch von nackter Plasmid-DNA um ein Vielfaches gesteigert werden kann.

In einer erst kürzlich publizierten Arbeit konnte sogar gezeigt werden, daß nach myokardialer UIMD-Transfektion in vivo mit Plasmid-DNA vergleichbare rekombinante Transgen-Level erzielt werden können wie mit Adenoviren (Chen 2003). Zudem konnte bei der Transfektion mit Plasmid-DNA im Gegensatz zum adenoviralen Gentransfer keine relevante Transgenexpression in der Leber und anderen extrakardialen Organen nachgewiesen werden (Chen 2001, 2003, Bekeredjian 2003). Vielmehr zeigte die nicht-beschallte Leber nach myokardialer UIMD-Transfektion mit Adenoviren höhere Enzymaktivitäten als das Myokard selbst (Chen 2003). Diese Daten weisen darauf hin, daß mit der UIMD-Methode der Gentransfer von Plasmid-DNA in vivo hoch effizient und mit der Effizienz viraler Vektoren vergleichbar ist, diese aber in Sachen Sicherheit und zielgerichteter lokaler Gentransfer übertrifft.

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.2. legen nahe, daß die in der Literatur beschriebene Verstärkung der ultraschall-induzierten Bioeffekte durch die Interaktion von Microbubbles im Schallfeld eine wesentliche Rolle beim vaskulären Gentransfer mit der UIMD-Methode spielt (Bao 1997). Die ultraschall-induzierte Destruktion der Microbubble-Carrier führt nicht nur über die lokale Freisetzung der Plasmid-DNA zu einer höheren DNA-Konzentration im Schallsektor, sondern auch durch die ballistischen Effekte zum Transfer der freigesetzten DNA und / oder der Microbubble-Carrier selbst in oder durch die Gefäßwand. Wie gezeigt werden konnte, haben die durch akustische Kavitation induzierten transienten Membranporen einen Durchmesser $\leq 5 \mu\text{m}$ (Taniyama 2002b), der zumindest größenbedingt auch die Aufnahme partieller oder sogar kompletter Microbubble-Vektoren ($3.0 \pm 1.5 \mu\text{m}$, s. Kap. 3.1.1.) ermöglichen könnte. So

konnte mit fluoreszenzmarkierten Alunex[®]-Microbubbles nach UIMD mit einer Expositionszeit von nur 1s die zelluläre Aufnahme von Bruchstücken der Albuminschale nachgewiesen werden (Greenleaf 1998).

Die erleichterte und verstärkte Kavitation durch akustisch aktive Microbubbles im Schallfeld geht mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einher, subletale Sonoporation zu induzieren, andererseits erzeugen die durch die Kavitation induzierten Effekte Schockwellen und Flüssigkeitsjets hoher Geschwindigkeiten auf die angrenzende Endothelzellmembran, was in Kombination den sehr raschen transmembranen Transfer erklären könnte. Dieser Mechanismus scheint plausibel und nur so kann die hohe Transfektionseffizienz der UIMD-Methode mit sehr kurzen Expositionszeiten unter Perfusionsbedingung erklärt werden.

Zudem wird die Hypothese durch die Beobachtung gestützt, daß nach UIMD mit LacZ-Reporterplasmiden die Intensität der β -Galaktosidase-Färbung innerhalb des Schallsektors in Flußrichtung nachläßt (s. Abb. 3.4. A). Vermutlich nimmt die Konzentration an suspendierten Microbubble-Vektoren durch die initial starke UIMD innerhalb weniger cm Flußstrecke rasch ab, was mit einer niedrigeren Transfektionsrate einhergeht. Grund scheint also die numerische Abnahme an akustisch aktiven Genvektoren zu sein, die für den Mechanismus des Gentransfers verantwortlich gemacht werden. Dieses Prinzip läßt sich auch auf die in Kapitel 3.2.3. beschriebene Abhängigkeit der unterschiedlichen Konzentrationen an Plasmid-DNA-beladenen Microbubble-Vektoren auf die Transfektionseffizienz übertragen. Nach initialer Herstellung der Microbubble-Vektoren mit einer Plasmid-DNA-Konzentration von 10 μ g/ml wurden die Suspensionen unterschiedlich stark mit nicht-beschallter Humanalbuminlösung verdünnt, so daß nicht nur die Gesamtmenge an Plasmid-DNA, sondern auch die Anzahl an Plasmid-DNA-beladenen Microbubble-Vektoren je nach Verdünnung abnimmt. Entsprechend korreliert die gemessenen Enzymaktivität positiv mit dem Grad der Verdünnung und somit der Anzahl an akustisch aktiven Microbubble-Vektoren in der Suspension (s. Abb. 3.6. C).

Diese Ergebnisse beschreiben den Effekt der Verdünnung auf die Transfektionseffizienz. Andere Arbeitsgruppen haben vor allem den alleinigen Effekt der Microbubble- oder der Plasmid-DNA-Konzentration auf die Gentransfereffizienz untersucht. Es ist bekannt, daß eine Erhöhung der Plasmid-DNA-Konzentration bei konstanter Anzahl an Microbubbles zu einer Steigerung der Transfektionseffizienz führt, die bei niedrigen DNA-Konzentrationen (bis 10 μ g/ml) einen exponentiellen Verlauf zeigt (Greenleaf 1998). Es scheint jedoch ab einer bestimmten Plasmid-DNA-Konzentration ein Sättigungsverhalten mit einem Effizienz-Plateau zu geben, was darauf hindeutet, daß die Transfektionsrate von

der Performance an Sonoporationsereignissen abhängt, die mit einer limitierten Aufnahmekapazität für Plasmid-DNA einhergeht (Greenleaf 1998). Eine Erhöhung der Plasmid-DNA-Konzentration bei der Herstellung pcDNA-beladener Microbubble-Vektoren durch elektromechanische Sonifikation führt nicht nur zu einem höheren DNA-Load der Microbubbles, sondern auch zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression nach UIMD-Transfektion (Frenkel 2002).

Die Effizienz der UIMD-Methode steigt nicht-linear mit der Anzahl an akustisch aktiven Microbubbles und auch hier kann ein Sättigungsverhalten beobachtet werden (Greenleaf 1998), wobei zu hohe Bubble-Konzentrationen sogar zu einer Abnahme der Transfektionseffizienz führen können (Greenleaf 1998, Taniyama 2002a). Möglicherweise kommt es aufgrund der höheren Bubble-Dichte zu einer stärkeren Schallabschwächung und somit zu weniger Kavitationsereignissen (Marsh 1997). Die für die UIMD-Transfektion optimale Microbubble-Konzentration betrug bei Greenleaf et al. $5.0 \times 10^7/\text{ml}$ und bei Taniyama et al. $1-3 \times 10^8/\text{ml}$. Diese Werte sind vergleichbar mit den in dieser Arbeit erfolgreich eingesetzten Bubble-Konzentrationen, so betrug die Anzahl an Microbubbles bei der $2\mu\text{g pcDNA/ml}$ - Verdünnung etwa $4.4 \times 10^7/\text{ml}$ und bei der Microbubble-Suspension mit $10\mu\text{g pcDNA/ml}$ etwa $2.18 \times 10^8/\text{ml}$. Die gesteigerte Transfektionseffizienz ist aber in diesen Experimenten wahrscheinlich durch die höhere Anzahl an Plasmid-DNA-tragenden Microbubble-Vektoren bedingt und weniger durch die alleinige Änderung der Bubble-Konzentration.

Interessant sind die Ergebnisse der Versuchsreihe zum Effekt der Perfusionsgeschwindigkeit auf die UIMD-Transfektion (s. Kap. 3.2.3.). Eine Steigerung der Perfusionsrate auf das Fünffache unter gleichen experimentellen Bedingungen geht mit einer signifikanten Abnahme der β -Galaktosidase-Enzymaktivität einher. Geht man von der oben erörterten Hypothese aus, könnte man sich diesen Effekt so erklären, daß es durch den hohen Fluß bei nur 5 Sekunden Expositionszeit zu einem örtlichen Missmatch zwischen der durch die UIMD bedingten Freisetzung der Plasmid-DNA und der induzierten Bioeffekte an den Zellstrukturen kommt. Andererseits könnte man vermuten, daß höhere Perfusionsraten vielleicht von Vorteil sind, da pro Zeiteinheit mehr Microbubble-Vektoren das Schallfenster betreten und so während der Transfektion mehr Kavitations-Einzelereignisse auftreten, wodurch auch die höhere Genexpression bei langsamer Perfusion im Vergleich zu statischen Transfektionsbedingungen erklärt wird (s. Abb. 3.6.). Zudem nimmt durch den höheren Fluß auch der Perfusionsdruck zu, der einen transmembranen Transfer begünstigt, zumal bekannt ist, daß mechanisch über transiente intravasale Druckerhöhung Gefäße erfolgreich mit Plasmid-DNA transfiziert werden können (Zhang 2001).

Die Verlängerung der Expositionszeit auf 30 s unter konstanter Perfusion bei 10ml/min führte wiederum zu einem Anstieg der Enzymaktivität auf vergleichbare Werte wie unter Standardbedingungen (s. Abb. 3.6. B), was darauf hindeutet, daß längere Expositionszeiten zu einer Steigerung der Transfektions-effizienz führt. Aus der Literatur ist bekannt, daß bei Transfektion mit Plasmid-DNA sowohl in vitro als auch in vivo längere Beschallungszeiten den Gentransfer steigern (Kim 1996, Greenleaf 1998, Anwer 2000). Vermutlich spielt bei dem hohen Fluß die druckbedingte Transfektion eine größere Rolle als die längere Expositionszeit per se, die jedoch auch hier von Bedeutung ist, da in dem längeren Zeitraum konstant neue Microbubble-Vektoren zerstört werden und so viel mehr Sonoporationseignisse auftreten können.

Interessanterweise konnten Greenleaf et al. zeigen, daß Microbubbles im Schallfeld (0.32MPa resp. 0.41MPa) in nur Bruchteilen einer Sekunde zerstört werden und daß innerhalb einer Sekunde eine Permeabilisierung der Zellmembran koinzident mit der UIMD auftritt. Demnach scheint innerhalb dieser kurzen Schallexpositionszeit vor allem die zeitliche Koinzidenz von UIMD und Sonoporation für die Transfektion verantwortlich zu sein, was indirekt zeigt, daß die für die Permeabilitätssteigerung verantwortlichen akustische Bioeffekte durch inerte Kavitation induziert werden (Greenleaf 1998). Längere Beschallungszeiten (>20s) sind deshalb nicht unbedingt notwendig, um höhere Transfektionsraten zu erzielen, wenn nicht neue intakte Microbubbles das Schallfenster betreten. So führten repetitive Schallexpositionen (4 x 1s) mit Erneuerung der Microbubble-Suspension vor jeder einzelnen Reexposition zu wesentlich höheren Gentransfereffizienzen als die einmalige kontinuierliche Beschallung mit 20-30s (43% vs. 15%) (Greenleaf 1998). Unter Perfusionsbedingung werden aber bei längerer Ultraschallexposition permanent neue Microbubble-Vektoren zur Verfügung gestellt und im Ultraschallsektor zerstört, wodurch konstant Sonoporation induziert und somit der Gentransfer effizient gesteigert wird.

4.4. Effekt der UIMD-Methode auf die Endothelintegrität

Es ist bekannt, daß die Zerstörung intravasaler Microbubbles durch Ultraschall zu einer Schädigung von Endothelzellen bevorzugt in Kapillaren und Arteriolen führt (Holland 1996, Skyba 1998, Miller 2000). Dies konnte erfolgreich zum interstitiellen Transfer von kolloidalen Partikeln, Proteinen oder genetischem Material genutzt werden (Price 1998, Mukherjee 2000). So wird das Unterbrechen der endothelialen Barriere als eine der Erklärungen für einen erfolgreichen myokardialen Gentransfer durch UIMD in vivo herangezogen (Shohet

2000, Chen 2001, Vannan 2002). Zudem konnte gezeigt werden, daß die Microbubble-Destruktion durch Ultraschall und die Anzahl an Kapillarrupturen direkt proportional zum mechanischen Index (MI) ist (Skyba 1998, Ay 2001).

Beim vaskulären Gentransfer, bei dem vor allem die Endothelschicht das gentherapeutische Ziel darstellt, würde sich eine Verletzung des Endothels ungünstig auswirken, vor allem in atherosklerotisch vorgeschädigten Gefäßen. Bei der Restenosebehandlung stehen jedoch auch die glatten Gefäßmuskelzellen der Media im Interesse des Gentransfers, die wie oben erwähnt aufgrund zahlreicher Barrieren nicht so leicht transfiziert werden können wie Endothelzellen, die in direktem Kontakt mit den Microbubble-Vektoren stehen. Über spezielle Nadel-Injektionskatheter ließe sich dieses Problem jedoch bewältigen (Mehdi 1996). Für den endothelialen Gentransfer ist es aber von entscheidender Bedeutung, daß die Integrität der Endothelfunktion gewahrt bleibt, zumal die Endothelzellen Produzent wichtiger anti-atherosklerotischer und anti-apoptischer Moleküle sind und essentieller Baustein zur Aufrechterhaltung wichtiger physiologischer Funktionen des Gefäßsystems darstellen (s. 4.5.).

Mit Gefäßsegmenten aus der linken Koronararterie wurden zur ex vivo UIMD-Transfektion größere Leitarterien verwendet, deren Intima im pathophysiologischen Prozeß der Atherosklerose regelmäßig von der endothelialen Dysfunktion betroffen ist. Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Sicherheit dieser non-viralen Transfektionsmethode zu evaluieren, vor allem im Hinblick auf die durch Ultraschallexposition induzierten Bioeffekte auf das Endothel, da die Endothelzellen durch hydrodynamischen Stress mit starken Scherkräften aufgrund der schnellen Bewegungsänderungen akustisch kavitierender Microbubbles mechanisch stark beansprucht werden, was zur letalen Sonoporation oder direkten Sonolyse führen kann (Carstensen 1993). Neben der mikroskopischen Analyse einer morphologisch unauffälligen Endothelzellschicht (s. 3.2.1.) ergab auch die Messung der LDH –Aktivität keine Anzeichen auf einen zytotoxischen Effekt der UIMD-Transfektionsmethode (Daten nicht gezeigt). Funktionsuntersuchungen der mit LacZ-Plasmiden transfizierten Gefäßsegmente zeigten im Vergleich zu den Kontrollgefäßen keine Änderungen der Bradykinin-induzierten, endothelzell-abhängigen Vasorelaxation (s. 3.2.4.).

Die UIMD-Transfektionsmethode führt an größeren Blutgefäßen wie den Koronararterien offensichtlich zu keiner Gefäßverletzung und Beeinträchtigung der endothelialen Funktion. Auch an Karotisarterien von Ratten konnten keine zytotoxischen Effekte mit der UIMD-Methode nach Transfektion mit nackter Plasmid-DNA festgestellt werden; dabei wurden die Karotiden in vivo mit

2.5W/cm² für 2 min beschallt. Der entgültige Beweis einer funktionellen Integrität der Endothelzellschicht blieb jedoch aus (Taniyama 2002a).

4.5. *eNOS-Gentransfer mit der UIMD-Methode*

Um die Praktikabilität der UIMD-Transfektionsmethode für eine mögliche vaskuläre Gentherapie zu untersuchen, haben wir ein Plasmid eingesetzt, das für eine modifizierte Form der endothelialen NO-Synthase kodiert.

NO-Synthasen stellen ein herausragendes Potential für die vaskuläre Gentherapie dar, weil deren Substrat Stickstoffmonoxyd (NO) neben der Regulation von Perfusion und Blutdruck (Umans 1995) wichtige antiatherogene Effekte auf die Gefäßwand besitzt (Zeiher 1996, Lloyd-Jones 1996). Bereits in frühen Stadien der Atherosklerose ist die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxyd in der Gefäßwand aufgrund einer reduzierten NO-Synthese und/ oder einer Inaktivierung von NO durch freie Radikale vermindert (Oemar 1998). Die Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der endothelialen Dysfunktion (Cohen 1995), die schon bei Vorhandensein atherosklerotischer Risikofaktoren wie Bluthochdruck und Hypercholesterinämie (Zeiher 1993), Nikotin (Zeiher 1995), Diabetes mellitus (Williams 1996) und im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses (Zeiher 1993) auftreten kann und sich in einer verminderten endothelabhängigen Vasorelaxation und gesteigerten Adhäsion von zirkulierenden weißen Blutzellen manifestiert (Oemar 1998).

Der vaskuläre NOS-Gentransfer setzt sich zum Ziel, die Bioverfügbarkeit von NO vor allem in atherosklerotisch vorgeschädigten Gefäßen oder auch bei Situationen mit sehr hohem Atherosklerose-Risiko zu verbessern.

Bekannt sind 3 Isoformen der NO-Synthase (NOS) mit nahezu identischer molekularer Struktur. Als Kofaktoren werden u.a. Calmodulin, Flavine, NADPH und Tetrahydrobiopterin benötigt, um die dimere Proteinstruktur aufrechtzuerhalten und NO durch Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin zu synthetisieren (Michel 1997, Stuehr 1999). Die neuronale (*n*NOS) und endotheliale (*e*NOS) Isoform werden konstitutiv exprimiert und bevorzugt Ca²⁺-abhängig über Calcium-Calmodulin aktiviert, das induzierbare Isoenzym (*i*NOS) wird unabhängig von einer Stimulation durch Agonisten oder intrazellulärem Ca²⁺ primär auf transkriptionellem Niveau reguliert (Griffith 1995).

Das in der Gefäßwand dominierende Isoenzym ist die von Endothelzellen exprimierte endotheliale NO-Synthase. Diese kann rezeptor-vermittelt durch Agonisten wie Acetylcholin, Substanz P oder Bradykinin aktiviert werden, dabei

kommt es über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und Bindung von Calcium-Calmodulin zur Enzymaktivierung durch Dislokation von Caveolin und Lösung der eNOS aus der Membranbindung (Prabhakar 1998).

Durch die physiologische Schubspannung (*shear stress*) oder auch Bindung von VEGF an seinen Rezeptor kann die eNOS über einen Ca^{2+} -unabhängigen Signaltransduktionsweg aktiviert werden (Fulton 1999). Die Wirkung der Schubspannung auf das Endothel führt zur Aktivierung der Proteinkinase B (*Akt*), die Ca^{2+} -unabhängig die endotheliale NO-Synthase an der Aminosäure Serin in Position 1177 phosphoryliert, was zu einem 2-3fachen Anstieg der basalen Enzymaktivität führt (s. Abb. 4.1.). So werden die gut untersuchten vaskuloprotektiven Effekte von regelmäßiger körperlicher Betätigung auf die shear stress-induzierte Stimulation der eNOS mit konsekutiver NO-Freisetzung zurückgeführt (Niebauer 1996, Gielen 2001).

eNOS-Aktivität

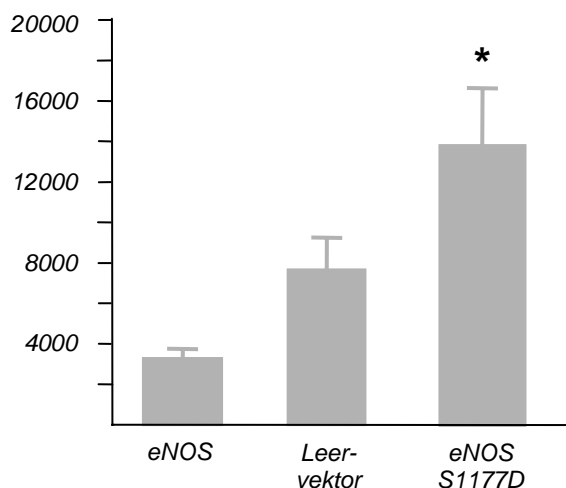


Abb. 4.1.:

eNOS- Transfektion von HUVEC

Nach Transfektion von HUVEC mit der Wildtyp-eNOS (eNOSwt) oder dem phosphomimetischen eNOS-Konstrukt (eNOS S1177D) wurde eNOS-Protein isoliert und die Enzymaktivität mit Hilfe eines Citrullin-Assays bestimmt (Daten aus Dimmeler et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur UIMD-Transfektion der Koronararterien eine modifizierte Variante der eNOS eingesetzt, bei der die Aminosäure Serin in Position 1177 (Ser1177) durch Aspartat ausgetauscht wurde (S1177D). Dadurch wird die aktive phosphorylierte Form der endogenen eNOS initiiert (s. Abb. 4.2.) und so die physiologische shear stress-induzierte Stimulation simuliert. Diese modifizierte eNOS wird deshalb auch als *phosphomimetisches eNOS-Konstrukt S1177D* bezeichnet. Wie in vitro gezeigt werden konnte, führt die Transfektion von HUVEC mit dem phosphomimetischen eNOS-Konstrukt (pcDNA-eNOSmtS1177D) zu einer etwa doppelten Enzymaktivität im Vergleich zur Transfektion mit dem eNOS-Wildtyp (s. Abb. 4.1.). Eine erfolgreiche Transfektion führt demnach zur Genexpression einer enzymatisch aktiven Form der

eNOS und somit zu basal höheren NO-Spiegeln unabhängig von einer endothel-vermittelten Stimulation.

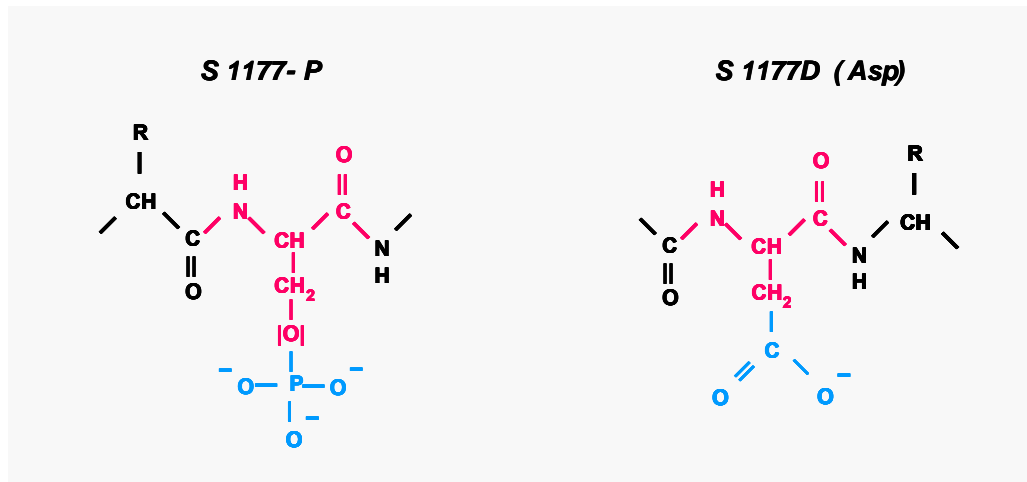


Abb. 4.2.: Strukturverwandschaft der phosphorylierten Aminosäure Serin mit Aspartat

Die sterische Imitation von Aspartat (S1177D) mit der bei Aktivierung von eNOS in Position 1177 phosphorylierten Aminosäure Serin (S1177-P) macht man sich beim Einsatz des phosphomimetischen eNOS-Konstrukts (pcDNA-eNOSmtS1177D) zunutze. Erläuterungen siehe Text.

Die Experimente zum vaskulären eNOS-Gentransfer wurden unter den experimentellen Standardbedingungen durchgeführt (s. Kap. 2.3.3.). Die Koronararteriensegmente wurden mit diagnostischem Ultraschall (USE = 5s, 1.2 MI, 2.2/4.4 MHz, 173 fps) unter Perfusion mit pcDNA-beladenen Microbubbles bei einer Plasmidkonzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Microbubble-Suspension und einer Perfusionsrate von 2ml/min transfiziert.

Nach den grundlegenden Experimenten zur Transfektion mit β -Galaktosidase-kodierenden Plasmiden konnte mit der UIMD-Methode unter Standardbedingungen ein erfolgreicher vaskulärer Gentransfer mit eNOS-Plasmid-DNA erzielt und rekombinantes eNOS-Protein in der Gefäßwand nachgewiesen werden (s. Kap. 3.3.1.). Aufgrund der gleichen experimentellen Bedingungen wie unter Transfektion mit LacZ-Plasmid-DNA kann davon ausgegangen werden, daß das Transgen vor allem im Endothel exprimiert wird, auch wenn dies nicht explizit für den eNOS-Gentransfer nachgewiesen wurde. Interessant ist die in der Literatur beschriebene vermehrte eNOS-Transgenexpression in adventitiellen Fibroblasten nach transluminalem adenoviralem Gentransfer (Sato 2000). Neben den für die LacZ-Transfektion angegebenen Gründen (s. oben)

wird für den eNOS-Gentransfer eine zellspezifische Transgenexpression in der Adventitia diskutiert, zumal die eNOS-Expression mit dem Vorkommen von Caveolin in der Zellmembran von adventitiellen Fibroblasten assoziiert ist (Chen 1997). Die eNOS-Expression in der Adventitia ist nicht ohne Bedeutung und kann unter bestimmten Umständen von Nutzen sein. Bei fehlender oder stark geschädigter Endothelschicht stellt der adventitielle eNOS-Gentransfer eine alternative Möglichkeit dar, rekombinantes eNOS-Protein in der Gefäßwand zu exprimieren und somit die stark eingeschränkte NO-Produktion zu erhöhen (Tsutsui 1998). So konnte gezeigt werden, daß eine adventitielle eNOS-Genexpression in vivo mit basal erhöhten cGMP-Spiegeln einhergeht und trotz fehlender Endothelschicht zu einer Verbesserung der vasomotorischen Funktion führen kann (Chen 1997).

Die Transfektion der Koronararteriensegmente wurde zunächst mit dem eNOS-Wildtyp (pcDNA-eNOSwt) durchgeführt. Dies basierte auf der Hypothese, daß eine erfolgreiche Transgenexpression zu einem erhöhten Level an Enzym in den Endothelzellen führt (s. Abb. 4.2.) und bei einem rezeptor-vermittelten Stimulus durch Bradykinin oder Acetylcholin mehr NO synthetisiert wird, was zu einer gesteigerten endothel-abhängigen und somit NO-vermittelten Vasorelaxation führt (Kullo 1997, Channon 1998). Obwohl in der Gefäßwand rekombinantes eNOS-Protein detektiert werden konnte, zeigte die vasoreaktive Antwort auf Bradykinin keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu vector-transfizierten Gefäßringen (Daten nicht gezeigt). Vergleichbare Ergebnisse an intakten, nicht atherosklerotisch veränderten Gefäßen sind auch nach adenoviraler Transduktion mit eNOS (*AdeNOS*) in der Literatur beschrieben (Lund 2000). Dies läßt vermuten, daß bei gesunden Koronararterien mit intaktem Endothel ein rezeptor-vermittelter vasodilatatorischer Stimulus die endogene eNOS so stark aktiviert, daß sich ein basal erhöhtes Level an eNOS nicht meßbar auf das vasorelaxierende Verhalten auswirkt oder daß möglicherweise diese Methode nicht sensitiv genug ist, um eine basal gesteigerte NO-Synthese detektieren zu können. Möglich wäre auch eine zu niedrig gewählte Konzentration an Plasmid-DNA, so konnte nach *AdeNOS*-Gentransfer eine Abhängigkeit der rezeptor-vermittelten Vasorelaxation von der Vektordosis beobachtet werden (Sato 2000). Entgegen diesen Hypothesen konnten Kullo et al. an intakten Karotisarterien in vivo zeigen, daß nach *AdeNOS*-Gentransfer und Überexpression rekombinanter eNOS die endothel-abhängige Vasorelaxation auf Acetylcholin signifikant erhöht ist (Kullo 1997). Auch andere Arbeitsgruppen konnten an intakten Gefäßen nach intraluminalen Gentransfer mit *AdeNOS* eine funktionell wirksame Transgenexpression mit gesteigerter rezeptor-ver-

mittelter Vasorelaxation (Bradykinin oder Acetylcholin) erzielen (Channon 1998, Ooboshi 1998, Aschner 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte mit rezeptor-vermittelter Stimulation kein signifikanter Effekt an eNOS-transfizierten intakten Koronararteriensegmenten eruiert werden. Dies führte zu der Überlegung, 1. mit dem phosphomimetischen eNOS-Konstrukt zu transfizieren, das nach Transgenexpression als aktiviertes Enzym unabhängig von einem Stimulus basal mehr NO synthetisiert und 2. eine andere Methode zur Messung der NO-vermittelten (endothel-abhängigen) Vasoreaktivität anzuwenden.

Mit der unter 2.6.1. beschriebenen Methode kann untersucht werden, in welchem Ausmaß die transfizierten Koronararteriensegmente auf einen vaso-konstriktorisches Stimulus mit einer isometrisch gemessenen Kontraktion reagieren. Eingesetzt wurde ein Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Analogon ($PGF_{2\alpha}$), das an den Thromboxanrezeptor glatter Gefäßmuskelzellen bindet und G-Protein-vermittelt über den second messenger IP_3 und Erhöhung des intrazellulären Calciums zu einer Vasokonstriktion führt. Isometrische Kontraktion von Arterien stimuliert die endotheliale NO-Produktion, die mit zunehmendem Vasotonus ansteigt und bei etwa 30% der KCl-induzierten Vorkontraktion ihr Maximum erreicht (Fleming 1999). Durch Applikation des NOS-Inhibitors N^o-monomethyl-L-Arginin (LNMA) kann die gesteigerte NO-Synthese gehemmt werden, was die Sensitivität für $PGF_{2\alpha}$ wieder verbessert und zu einem Anstieg der Vasokonstriktion führt. Die Gabe von LNMA ohne Vorkontraktion bei passiver Dehnung der Gefäßringe führt jedoch zu keinem Anstieg des Vasotonus (Fleming 1999). Die Gefäßringe wurden mit $PGF_{2\alpha}$ auch deshalb nur leicht ($0.1\mu M$ $PGF_{2\alpha}$) vorkontrahiert, um die endogene eNOS nicht zu stark zu aktivieren und so die basal höhere eNOS-Aktivität nach Transfektion mit dem phosphomimetischen eNOS-Konstrukt erfassen zu können. Bei leichter vasokonstriktorisches Stimulation könnte so eine basal höhere eNOS-Aktivität unabhängig von einer Agonistenstimulation die Tonuszunahme nach Applikation von $PGF_{2\alpha}$ reduzieren.

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.2. zeigen, daß die Transfektion des phosphomimetischen eNOS-Konstrukts mit der UIMD-Methode zu einer etwa 60%igen Reduktion der durch $PGF_{2\alpha}$ -induzierten Vorkontraktion führt. Die verminderte Tonuszunahme wird über eine gesteigerte NO-Synthese vermittelt, da durch die Gabe des NOS-Inhibitors LNMA dieser Effekt antagonisiert werden konnte, was zu einem signifikanten Anstieg des Gefäßtonus im Vergleich zu den Kontrollgefäßen führte. Die 60%ige NO-vermittelte Reduktion der $PGF_{2\alpha}$ -induzierten Vorkontraktion entspricht theoretisch einer ~ 3fach höheren Enzymaktivität der

eNOSmtS1177D-transfizierten Gefäßsegmente. Diese Ergebnisse sind annähernd mit den in vitro Daten von Dimmeler et al. vergleichbar (s. Abb. 4.2.).

Ein kritischer Aspekt dieser Methode bleibt aber zu diskutieren, nämlich die Frage, ob dieser Effekt durch die erfolgreiche Transfektion mit dem eNOS-Konstrukt bedingt ist oder aber durch die induzierbare Isoform der NO-Synthase (iNOS), da die experimentellen Transfektionsbedingungen nur unter semi-sterilen Kautelen durchgeführt werden konnten und eine Kontamination oder vektor-induzierte Immunreaktion nicht ausgeschlossen werden kann, die zu einer Induktion der iNOS in der Gefäßwand führen könnte. Da der NOS-Inhibitor als falsches Substrat für alle NO-Synthasen die NO-Produktion inhibiert, ist er nicht spezifisch für die endotheliale Isoform und es kann nicht ausgeschlossen werden, daß der beobachtete Effekt auch über eine iNOS-Inhibition vermittelt wurde. Jedoch sprechen folgende Aspekte gegen diese Hypothese:

1. Die vector-transfizierten Gefäßsegmente zeigen kein hyporeaktives Verhalten nach Gabe von kontraktile Agonisten. Zudem unterscheiden sich vector- und eNOSmtS1177D-transfizierte Gefäßsegmente signifikant in ihrem vasoreaktiven Verhalten, was bei einer induzierten iNOS-Expression sicher nicht der Fall wäre, da alle Transfektionen unter gleichen experimentellen Bedingungen durchgeführt wurden und es unwahrscheinlich ist, daß die Transfektion mit eNOS-Plasmiden zu einer stärkeren iNOS-Induktion führt als die Transfektion mit dem Kontrollvektor.
2. Die induzierbare NO-Synthase produziert bei equimolarem Verhältnis weitaus mehr NO als die eNOS (Billiar 1995), was zu einer wesentlich stärkeren Vasorelaxation der Gefäßringe beider Experimentengruppen geführt hätte.
3. Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.2. sind tendenziell mit den in vitro Daten zur eNOSmt-Transfektion von HUVEC vereinbar (Dimmeler 1999). Das physiologische vasoreaktive Verhalten von vector-transfizierten Gefäßsegmenten als Kontrollgruppe macht somit eine mögliche sekundäre vektor-induzierte iNOS-Expression in der Gefäßwand unwahrscheinlich.

Andererseits kommt der iNOS beim vaskulären NOS-Gentransfer eine zunehmende Bedeutung zu. Obwohl die eNOS die prädominante Isoform in der Gefäßwand darstellt und deshalb auch in den meisten Experimenten zum NOS-Gentransfer bevorzugt eingesetzt wird, kann der Transfer von iNOS unter bestimmten Umständen von Vorteil sein. Die iNOS produziert im Gegensatz zur eNOS bei equimolarem Verhältnis unabhängig von Agonistenstimulation und shear stress viel höhere NO-Levels (Billiar 1995). Dieses Potential macht auch

die iNOS für einen vaskulären Gentransfer attraktiv, zumal nach erfolgreicher Transfektion diese Isoform mit anhaltend hoher Enzymaktivität exprimiert wird (Billiar 1995). Da oft geringe Gentransfereffizienzen und mangelnde Sicherheit des Genvektors die limitierenden Faktoren beim vaskulären Gentransfer darstellen, könnte durch eine iNOS-Transfektion nicht nur die Effizienz aufgrund einer verstärkten lokalen NO-Synthese verbessert werden, sondern auch die dazu benötigte Vektordosis reduziert und somit die vektor-assoziierten Nebenwirkungen minimiert werden. Shears et al. konnten zeigen, daß der adenovirale iNOS-Gentransfer (*AdiNOS*) an Karotisarterien von Ratten in vivo zu einer 97%igen Inhibition der Intimahyperplasie führt, wobei 100-1000fach niedrigere Virustiter im Vergleich zu den meisten Gentransferexperimenten mit *AdeNOS* eingesetzt wurden (Shears 1998).

Nach endogener oder traumatischer Verletzung der Gefäßwand, zum Beispiel im Rahmen einer perkutanen transluminalen Angioplastie, kommt es zu einer erhöhten iNOS-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen und neointimalem Gewebe (Yan 1998). Dabei besitzt die verstärkte NO-Produktion vor allem antithrombotische und antiproliferative Wirkung (Kibbe 1999). Es liegt daher nahe, iNOS bevorzugt nach Gefäßverletzungen zur Inhibition neointimaler Proliferation (Restenose-Prävention) therapeutisch einzusetzen. Es muß aber kritisch bedacht werden, daß durch die hohe und anhaltende iNOS-Aktivität zwar mehr NO synthetisiert wird ($\uparrow V_{\max}$), jedoch kann die hohe Enzymaktivität zu einer starken Bildung von Superoxid führen, das die Bioaktivität von NO herabsetzt und zu Peroxynitrit reagieren kann (White 1994, Xia 1998).

Dies macht klar, daß eine starke Überexpression von NOS trotz hoher Enzymaktivität nicht unbedingt die NO-Bioverfügbarkeit verbessert und mit der Bildung zytotoxischer Reaktionsprodukte einhergehen kann (Beckman 1996). Dies gilt vor allem für vorgeschädigte Gefäße und in besonderem Maße in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose (Wever 1998), da der erhöhte oxidative Stress die NO-Inaktivierung mit Bildung freier Radikale begünstigt. Bei fortgeschrittener Gefäßwandschädigung steht vielmehr eine NOS-Dysregulation im Vordergrund, bei der ein Mangel an Kofaktoren der NO-Synthase und an antioxidativen Substanzen von großer Bedeutung ist. So kann die Koexpression von antioxidativ wirkenden Transgenen protektive Wirkung haben und die Endothelfunktion verbessern (Lang 1997, Zanetti 1999). Die NOS-Dysregulation hat demnach wichtige Konsequenzen für den vaskulären Gentransfer von NO-Synthasen, an den die Anforderung einer optimalen Transgenexpression gestellt wird. Nicht nur die adequate Erhöhung der NO-Synthese, sondern auch

die Verbesserung der NO-Bioverfügbarkeit stehen dabei im Vordergrund, um so potentielle, transgen-induzierte Negativeffekte zu vermeiden.

In den meisten Experimenten zum vaskulären NOS-Gentransfer wurden fast ausschließlich adenovirale Vektoren eingesetzt. Der adenovirale NOS-Gentransfer ist hoch effizient, geht jedoch mit einem höheren Risiko einer vektor-induzierten Immunantwort einher (s. Kap. 1.2.1.). In dieser Arbeit konnte mit der UIMD eine virus-freie Transfektionsmethode für den vaskulären NOS-Gentransfer entwickelt werden, die mit größerer Sicherheit und ebenfalls hoher Transfektionseffizienz einhergeht.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte eine neue virus-freie Transfektionsmethode für den vaskulären Gentransfer an einem *ex vivo* Modell an Koronararterien etabliert werden. Es wird gezeigt, daß durch ultraschall-induzierte Destruktion von Microbubble-Vektoren (UIMD) ein lokaler Transfer von Plasmid-DNA in die Gefäßwand mit hoher Effizienz und Sicherheit erzielt werden kann. Die Praktikabilität dieser Methode wird durch einen erfolgreichen eNOS-Gentransfer in die Gefäßwand unter Beweis gestellt. Dabei führen schon niedrige Plasmid-DNA-Konzentrationen zur Expression eines funktionell aktiven, rekombinanten eNOS μ t-Proteins mit basal erhöhter NO-Produktion. Dies läßt sich bei der endothelialen Funktionstestung durch eine signifikante und nachweislich NO-vermittelte Reduktion der durch Prostaglandin F_{2 α} -induzierten Vasokonstriktion nachweisen.

Zunächst konnte in dieser Arbeit erfolgreich gezeigt werden, daß es möglich ist, durch Zusatz von Plasmid-DNA bei der elektromechanischen Sonifikation von Humanalbumin Microbubble-Vektoren herzustellen, in deren Albuminschale die Plasmid-DNA inkorporiert ist.

In einem nächsten Schritt konnte gezeigt werden, daß an dem in dieser Arbeit entwickelten *ex vivo*-Perfusions-Modell an Koronararterien durch ultraschall-induzierte Destruktion intravasal verabreichter Microbubble-Vektoren vor allem die Endothelzellschicht effizient mit Reporterplasmiden (*LacZ*) transfiziert werden kann.

Dabei wurde zunächst ein Standardverfahren etabliert, bei dem die Koronararterien mit Microbubble-Vektoren bei einer Geschwindigkeit von 2 ml/min perfundiert und in einem definierten Ultraschallsektor für 5s im harmonic imaging-Modus gescannt wurden. Die Transfektionseffizienz korreliert dabei positiv mit der Konzentration an Microbubble-Vektoren im Perfusat. Experimente zum Einfluß der Perfusion auf die UIMD-Transfektion zeigten, daß die Perfusion mit 2ml/min verglichen mit statischen Versuchsbedingungen einen positiven Einfluß auf die Transfektionseffizienz nimmt. Eine Steigerung der Flußrate um den Faktor 5 geht jedoch mit einer signifikanten Abnahme der Expression rekombinanter β -Galaktosidase mit verminderter Enzymaktivität in der Gefäßwand einher. Unter gleichen experimentellen Bedingungen konnte durch längere Ultraschallexpositionen die Transgenexpression wiederum gesteigert werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit war es nachzuweisen, daß die UIMD-Transfektionsmethode an Leitarterien wie den Koronargefäßen ein sicheres Verfahren zum endothelialen Gentransfer darstellt und keine morpholo-

gischen oder funktionellen Endothelschäden hervorruft. Dies konnte histologisch und durch endothel-abhängige Funktionsmessungen an Gefäßringen von transfizierten Koronargefäßen erfolgreich gezeigt werden. Zudem ergaben Messungen der LDH-Enzymaktivität bei transfizierten Gefäßen kein Hinweis auf einen zytotoxischen Effekt der UIMD-Transfektionsmethode.

In einem letzten Schritt konnte gezeigt werden, daß sich die UIMD-Transfektionsmethode exzellent für einen vaskulären eNOS-Gentransfer eignet. Erfolgreiche Transfektion gesunder Koronararterien mit dem *phosphomimetischen* eNOS-Konstrukt geht mit einem verminderten Gefäßtonus einher und führt zu einer etwa 60%igen NO-vermittelten Reduktion der durch Prostaglandingabe provozierten Gefäßkontraktion.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die ultraschall-unterstützte Transfektion mit Plasmid-DNA-beladenen Microbubbles ein sehr effizientes und nicht-toxisches Verfahren zum non-viralen Gentransfer in die Gefäßwand von größeren Leitarterien darstellt.

Die Herausforderung an die Zukunft wird sein, an verschiedenen in vivo Modellen die Praktikabilität dieser Methode sicherzustellen und zu zeigen, daß die hohe Transfektionseffizienz und Sicherheit auch in vivo gewährleistet ist. Dann könnten durch intravasale Injektion über katheter-basierte Verfahren oder sogar durch intravenöse Gabe gezielt vaskularisierte Organbereiche nicht-/ minimal-invasiv therapeutisch angegangen werden. So wäre nicht nur eine gentherapeutische Anwendung der UIMD-Methode bei kardiovaskulären Erkrankungen denkbar, sondern auch in der Onkologie als optionale Therapiemöglichkeit bei malignem Tumorleiden. Zum Beispiel könnte durch Transfektion mit *anti*-Tumor- oder *anti*-Angiogenese- Genen lokal das Tumorwachstum gehemmt werden.

6. Literaturverzeichnis

- Aird W.C., Jahroudi N., Weiler-Guettler H., Rayburn H., Rosenberg R.D. (1995). Human von Willebrand factor gene sequences target expression to a subpopulation of endothelial cells in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4567-4571.
- AIUM (American Institute of Ultrasound in Medicine). Mechanical bio effects from diagnostic ultrasound. AIUM consensus statements – definitions and descriptions of non-thermal mechanisms. *J Ultrasound Med* (2000) 19:77-84.
- Amara R.R., Villinger F., Altman J.D., Lydy S.L., O'Neil S.P., Staprans S.I., Montefiori D.C., Xu Y., Herndon J.G., Wyatt L.S., Candido M.A., Kozyr N.L., Earl P.L., Smith J.M., Ma H.L., Grimm B.D., Hulse M.L., Miller J., McClure H.M., McNicholl J.M., Moss B., Robinson H.L. (2001). Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 292: 69-74.
- Anwer K., Kao G., Proctor B., Anscombe I., Florack V., Earls R., Wilson E., McCreery T., Unger E., Rolland A., Sullivan S.M. (2000). Ultrasound enhancement of cationic lipid-mediated gene transfer to primary tumors following systemic administration. *Gene Ther* 7:1833-1839.
- Apfel R.E., Holland C.K. (1991). Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 17:175-185.
- Aschner J.L., Kovacs N., Perciaccante J.V., Figueroa J.P., Thrikawala N., Robins G.S., Busija D.W. (1999). Endothelial nitric oxide synthase gene transfer enhances dilation of newborn piglet pulmonary arteries. *Am J Physiol* 277 (Heart Circ Physiol 46): H371-H379.
- Atchley A.A., Frizzell L.A., Apfel R.E., Holland C.K. Madanshetty S., Roy R.A. (1988). Thresholds for cavitation produced in water by pulsed ultrasound. *Ultrasonics* 26:280-285.
- Ay T., Havaux X., van Camp G., Campanelli B., Gisellu G., Pasquet A., Denef J., Melin J.A., Vanoverschelde J.J. (2001). Destruction of contrast microbubbles by ultrasound: Effects on myocardial function, coronary perfusion pressure and microvascular integrity. *Circulation* 104:461-466.
- Baek S., March K.L. (1998). Gene therapy for restenosis: getting nearer the heart of the matter. *Circ Res* 82:295-305.
- Bao S., Thrall B.D., Miller D.L. (1997). Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound Med Biol* 23:953-959.
- Bao S., Thrall B.D., Gies R.A., Miller D.L. (1998). In vivo transfection of melanoma cells by lithotripter shock waves. *Cancer Res* 58:219-221.
- Baumgartner I., Pieczek A., Manor O., Blair R., Kearney M., Walsh K., Isner J.M. (1998). Constitutive expression of phVEGF₁₆₅ after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 97:1114–1123.
- Bauters C., Isner J.M. (1997). The biology of restenosis. *Progr Cardiovasc Dis* 40:107-116.
- Beckman J.S., Koppenol W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol* 271:C1424-C1437.
- Beeri R., Guerrero J.L., Supple G., Sullivan S., Levine R.A., Hajjar R.J. (2002). New efficient catheter-based systems for myocardial gene delivery. *Circulation* 106:1756-1759.
- Bekerredjian R., Chen S., Frenkel P.A., Grayburn P.A., Shohet R.V. (2003). Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart. *Circulation* 108:1022-1026.
- Bettan M., Emmanuel F., Darteil R., Caillaud J.M., Soubrier F., Delaere P., Branelec D., Mahfoudi A., Duverger N., Schermann D. (2000). High-level protein secretion into blood circulation after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *Mol Ther* 2:204-210.
- Billiar T.R. (1995). Nitric oxide: Novel biology with clinical relevance. *Ann Surg* 221:339-349.

- Blaese R.M., Culver K.W., Miller A.D., Carter C.S., Fleisher T., Clerici M., Shearer G., Chang L., Chiang Y., Tolstoshev P. (1995). T-lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270:475-480.
- Bordignon C., Notarangelo L.D., Nobili N., Ferrari G., Casorati G., Panina P., Mazzolari E., Maggioni D., Rossi C., Servida P. (1995). Gene therapy in peripheral lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science* 270:470-475.
- Boussif O., Lezoualch F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.P. (1995). A novel versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7297-7301.
- Brand K., Arnold W., Bartels T., Lieber A., Kay M.A., Strauss M., Dorken B. (1997). Liver-associated toxicity of the HSV-tk/GCV approach and adenoviral vectors. *Cancer Gene Ther* 4:9-16.
- Burns P.N., Powers J.E., Fritzsche T. (1992). Harmonic imaging, a new imaging and Doppler method for contrast enhanced ultrasound. *Radiology* 185:142A.
- Burns P.N., Powers J.E., Simpson D.H., Uhlendorf V., Fritzsche T. (1996). Harmonic imaging: principles and preliminary results. *Clin Radiol* 51(Suppl I):50-55.
- Carstensen E.L., Kelly P., Church C.C., Brayman A.A., Child S.Z., Raeman C.H., Schery L. (1993). Lysis of erythrocytes by exposure to CW ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 19:147-165.
- Caruso M. (1996). Gene therapy against cancer and HIV infection using the gene encoding herpes simplex virus thymidine kinase. *Mol Med Today* 2:212-217.
- Chang D.C., Reese T.S. (1990). Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy. *Biophys J* 58:1-12.
- Channon K.M., Qian H.S., Neplioueva V., Blazing M.A., Olmez E., Shetty G.A., Youngblood S.A., Stamler J.S., George S.E. (1998). In vivo gene transfer of nitric oxide synthase enhances vasomotor function in carotid arteries from normal and cholesterol-fed rabbits. *Circulation* 98:1905-1911.
- Chen A.F.Y., Jiang S., Crotty T.B., Tsutsui M., Smith L.A., O'Brien T., Katusic Z.S. (1997). Effects of in vivo adventitial expression of recombinant endothelial nitric oxide synthase gene in cerebral arteries. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12568-12573.
- Chen S., Wang Z., Zhou Y.T., Grayburn P.A. (2000). Optimization of the size distribution and myocardial contrast effect of perfluorocarbon-filled albumin microbubbles by lyophilization under continuous negativ pressure. *J Am Soc Echocardiogr* 13:748-753.
- Chen S., Shohet R.V., Frenkel P.A., Mayer S., Unger R.H., Grayburn P.A. (2001). Successful expression of plasmid DNA in rat myocardium by ultrasound targeted microbubbles destruction. *J Am Coll Cardiol* 48:232-248.
- Chen S., Shohet R.V., Bekeredjian R., Frenkel P.A., Grayburn P.A. (2003). Optimization of ultrasound parameters for cardiac gene delivery of adenoviral or plasmid deoxyribonucleic acid by ultrasound-targeted microbubble destruction. *J Am Coll Cardiol* 42:301-308.
- Christiansen J.P., French B.A., Matsumura M., Klibanov A., Lindner J.R. (2001). Transfection of plasmid DNA in muscle tissue with ultrasound and cationic microbubble vehicles. 12th Annual Scientific Sessions of the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 14:426.
- Cohen R.A. (1995). The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 38:105-128.
- Cohen J.L., Cheirif J., Segar D.S., Gillam L.D., Gottdiener J.S., Hausnerova E., Bruns D.E. (1998). Improved left ventricular endocardial border delineation and opacification with Optison (FS069), a new echocardiographic contrast agent. *J Am Coll Cardiol* 32:746-752.
- Comis A., Easterbrook-Smith S.B. (1986). Inhibition of serum complement haemolytic activity by lipid vesicles containing phosphatidylserine. *FEBS Lett* 197:321-327.

- Cowan P.J., Tsang D., Pedic C.M., Abbott L.R., Shinkel T.A., d'Apice A.J.F., Pearse M.J. (1998). The human ICAM-2 promoter is endothelial cell-specific in vitro and in vivo and contains critical SP1 and GATA binding sites. *J Biol Chem* 273:11737-11744.
- Dachs G.U., Patterson A.V., Firth J.D., Ratcliffe P.J., Townsend K.M., Stratford I.J., Harris A.L. (1997). Targeting gene expression to hypoxic tumor cells. *Nat Med* 3:515-520.
- Davies K. (2000). Arrested development. *Mol Ther* 1:16-17.
- Davis G.E. (1992). The Mac-1 and p159,95 β_2 integrins bind denaturated proteins to mediate leukocyte cell-substrate adhesion. *Exp Cell Res* 200:242-252.
- de Jong N., Ten Cate F.J., Lancée C.T., Roelandt J.R., Bom N. (1991). Principles and recent developments in ultrasound contrast agents. *Ultrasonics* 29:324-330.
- de Jong N. (1993a). Acoustic properties of ultrasound contrast agents. Woerden (The Netherlands): Zuidam and Zonen 1993:11.
- de Jong N. (1993b). Acoustic properties of ultrasound contrast agents. Rotterdam (The Netherlands): Zuidam and Zonen 1993:17-36/61-78.
- Delius M., Hofschneider P., Lauer U., Messmer K. (1995). Extracorporeal shock waves for gene therapy? *Lancet* 345:1377.
- de Vries W.R., Luijendijk S.C.M. (1982). Shape of single-breath washout curves of gases with different diffusion coefficients and blood solubilities. *Bull Eur Physiopathol Respir* 18:215-227.
- DeYoung M.B., Dichek D.A. (1998). Gene therapy for restenosis: are we ready? *Circ Res* 82:306-313.
- Donahue R.E., Kessler S.W., Bodine D., McDonagh K., Dunbar C., Goodman S., Agricola B., Byrne E., Raffeld M., Moen R. (1992). Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med* 176:1125-1135.
- Donahue J.K., Kikkawa K., Johns D.C., Marban E., Lawrence J.H. (1997). Ultrarapid, highly efficient viral gene transfer to the heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6664-6468.
- Eglitis M.A., Anderson W.F. (1998). Retroviral vectors for introduction of genes into mammalian cells. *Bio Techniques* 6:608-614.
- Engelhardt J.F., Ye X., Doranz B., Wilson J.M. (1994). Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 91:6196-6200.
- Farhood H., Serbina N., Huang L. (1995). The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochem Biophys Acta* 1235:289-295.
- Fechenheimer M., Boylan J.F., Parker S., Siskin J.E., Patel G.L., Zimmer S.G. (1987). Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:8463-8467.
- Feinstein S.B., Ten Gate F.J., Zwehl W., Ong K., Maurer G., Tei C., Shah P.M., Meerbaum S., Corday E. (1984). Two-dimensional contrast echocardiography . I: in vitro development and quantitative analysis of echo contrast agents. *J Am Coll Cardiol* 3:14-20.
- Feinstein S.B., Cheirif J., Ten Gate F.J., Silverman P.R., Heidenreich P.A., Dick C., Desir R.M., Armstrong W.F., Quinones M.A., Shah P.M. (1990). Safety and efficacy of a new transpulmonary ultrasound contrast agent: initial multicenter clinical results. *J Am Coll Cardiol* 16:316-324.
- Felgner P.L., Gadek T.R., Holm M., Roman R., Chan H.W., Wenz M., Northrop J.P., Ringold G.M., Danielsen M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7413-7417.
- Felgner P.L. (1997). Nonviral strategies for gene therapy. *Sci Am* 276:102-106.
- Ferrari S., Moro E., Pettenazzo A., Behr J.P., Zacchello F., Scarpa M. (1997). ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. *Gene Ther* 4:1100-1106.

- Fleming I., Bauersachs J., Schäfer A., Scholz D., Aldershvile J., Busse R. (1999). Isometric contraction induces the Ca^{2+} -independent activation of the endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1123-1128.
- Flomenberg P., Piaskowski V., Truitt R.L., Casper J.T. (1995). Characterization of human proliferative T cell responses to adenovirus. *J Infect Dis* 171:1090-1096.
- Flotte T.R., Carter B.J. (1995). Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Ther* 2:357-362.
- Flugelman M.Y., Virmani R., Leon M.B., Bowman R.L., Dichek D.A. (1992). Genetically engineered endothelial cells remain adherent and viable after stent deployment and exposure to flow in vitro. *Circ Res* 70:348-354.
- Flynn H.G. (1964). Physics of acoustic cavitation in liquids. Mason W.P., ed. *Physical Acoustics*, New York: Academic press IB:58-172.
- Fogarty I.C.C. (1971). The prospects of gene therapy. *DHEW Publication (NIH)* 26:61-72.
- Frenkel P.A., Chen S., Thai T., Shohet R.V., Grayburn P.A. (2002). DNA-loaded albumin microbubbles enhance ultrasound mediated transfection. *J Ultrasound Med* 28:817-822.
- Friedmann T. (1997). Overcoming the obstacles to gene therapy. *Sci Am* 276:79-85.
- Fulton D., Gratton J.P., McCabe T.J., Fontana J., Fujio Y., Walsh K., Franke T.F., Papapetropoulos A., Sessa W.C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399:597-601.
- Gaitan D.F., Crum L.A. (1990). Observation of sonoluminescence from a single stable cavitation bubble in a water/glycerine mixture. In: Hamilton M.F., Blackstock D.T. eds. *Frontiers of nonlinear acoustics: Proceedings of the 12th ISNA*. London: Elsevier Science Publishers.
- Gallo S.A., Oseroff A.R., Johnson P.G., Hui S.W. (1997). Characterization of electric-pulse-induced permeabilization of porcine skin using surface electrodes. *Biophys J* 72:2805-2811.
- Ganten D. (1997). James D. Watson at the congress of molecular medicine. *J Mol Med* 75:615-617.
- Gao X., Huang L. (1995). Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther* 2:710-722.
- Gershon H., Ghirlando R., Guttman S.B., Minsky A. (1993). Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochem* 32:7143-7151.
- Gibbons G.H., Dzau V.J. (1996). Molecular therapies for vascular diseases. *Science* 272:689-693.
- Gielen S., Schuler G., Hambrecht R. (2001). Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. *Circulation* 103:E1-E6.
- Gordon D., Reidy M.A., Benditt E.P., Schwartz S.M. (1990). Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4600-4604.
- Graham F.L., van der Eb A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-467.
- Greenleaf W.J., Bolander M.E., Sarkar G., Goldring M.B., Greenleaf J.F. (1998). Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. *Ultrasound Med Biol* 24:587-595.
- Griffith O.W., Stuehr D.J. (1995). Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57:707-736.
- Harbottle R.P., Cooper R.G., Hart S.L., Ladhoff A., McKay T., Knight A.M., Wagner E., Miller A.D., Coutelle C. (1998). An RGD-oligolysine peptide: a prototype construct for integrin-mediated gene delivery. *Hum Gene Ther* 9:1037-1047.
- Hellbrust H., Christiansen C., Skotland T. (1993). Biochemical characterization of air-filled albumin microspheres. *Biotechnol Appl Biochem* 18:227-237.

- Hofland H.E., Nagy D., Liu J.J., Spratt K., Lee Y.L., Danos O., Sullivan S.M. (1997). In vivo gene transfer by intravenous administration of stable cationic lipid/DNA complex. *Pharm Res* 14:742-749.
- Holland C.K., Deng C., Apfel R.E. (1996). Direct evidence of cavitation in vivo. *Ultrasound Med Biol* 22:917-925.
- Huber P.E., Pfisterer P. (2000). In vitro and in vivo transfection of plasmid DNA in the Dunning prostate tumor R3327-AT1 is enhanced by focused ultrasound. *Gene Ther* 7:1516-1525.
- Hui S.W., Langner M., Zhao Y.L., Ross P., Hurley E., Chan K. (1996). The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer. *Biophys J* 71:590-599.
- Iademarco M.F., McQuillan J.J., Rosen G.D., Dean D.C. (1992). Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem* 267:16323-16329.
- Indolfi C., Stabile E., Perrino C., Chiariello M. (1998). Mechanisms of restenosis after angioplasty and approach to therapy. *Int J Mol Med* 2:143-148.
- Isner J.M., Walsh K., Symes J., Pieczek A., Takeshita S., Lowry J., Rosenfield K., Weir L., Brogi E., Juraj D. (1996). Arterial gene transfer for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Hum Gen Ther* 7:959-988.
- Kalka C., Masuda H., Takahashi T., Gordon R., Tepper O., Graveriaux E., Pieczek A., Iwaguro H., Hayashi S.-I., Isner J.M., Asahara T. (2000). Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res* 86:1198-1202.
- Kaplitt M.G., Leone P., Samulski R.J., Xiao X., Pfaff D.W., O'Malley K.L., During M.J. (1994). Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus in the mammalian brain. *Nat Genet* 8:148-154.
- Kasahara N., Dozy A.M., Kan Y.W. (1994). Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science* 266:1373-1376.
- Kaul S. (1996). Myocardial perfusion and other applications of contrast echocardiography. 2nd ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Co; 1996:480-503.
- Kay M.A., Glorioso J.C., Naldini L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature* 7:33-40.
- Keller M.W., Segal S.S., Kaul S., Duling B. (1989). The behavior of sonicated albumin microbubbles within the microcirculation: a basis for their use during myocardial contrast echocardiography. *Circ Res* 65:458-467.
- Kibbe M., Billiar T., Tzeng E. (1999). Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. *Cardiovasc Res* 43:650-657.
- Kichler A., Leborgne C., Coeytaux E., Danos O. (2001). Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J Gene Med* 3:135-144.
- Kim H.J., Greenleaf J.F., Kinnick R.R., Bronk J.T., Bolander M.E. (1996). Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Hum Gene Ther* 7:1339-1346.
- Kircheis R., Kichler A., Wallner G., Kursu M., Ogris M., Felzmann T., Buchberger M., Wagner E. (1997). Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther* 4:409-418.
- Kircheis R., Schuller S., Brunner S., Ogris M., Heider K.H., Zauner W., Wagner E. (1999). Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *J Gene Med* 1:111-120.
- Kircheis R., Wagner E. (2000). Polycation/DNA complexes for in vivo gene delivery. *Gene Ther and Reg* 1:95-114.
- Klibanov A.L. (1999). Targeted delivery of gas-filled-microspheres, contrast agents for ultrasound imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 37:139-157.

- Klimatcheva E., Rosenblatt J.D., Planelles V. (1999). Lentiviral vectors and gene therapy. *Front Biosci* 1:D481-496.
- Koch S., Pohl P., Cobet U., Rainov N.G. (2000). Ultrasound enhancement of liposome-mediated cell transfection is caused by cavitation effects. *Ultrasound Med Biol* 26:897-903.
- Kochanek S., Clemens P.R., Mitani K., Chen H-H., Chan S., Caskey C.T. (1996). A new adenoviral vector: replacement of all viral coding sequences with 28kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and β -galactosidase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93:5731-5736.
- Kovesdi I., Brough D.E., Bruder J.T., Wickham J. (1997). Adenoviral vectors for gene transfer. *Curr Opin Biotechnol* 8:583-589.
- Kullo I.J., Mozes G., Schwartz R.S., Gloviczki P., Tsutsui M., Katusic Z.S., O'Brien T. (1997). Enhanced endothelium-dependent relaxations after gene transfer of recombinant endothelial nitric oxide synthase to rabbit carotid arteries. *Hypertension* 30:314-320.
- Lambert R.C., Maulet Y., Dupont J.L., Mykita S., Craig P., Volsen S., Feltz A. (1996). Polyethylenimine-mediated DNA transfection of peripheral and central neurons in primary culture: probing Ca^{2+} channel structure and function with antisense oligonucleotides. *Mol Cell Neurosci* 7:239-246.
- Lang M.G., Faraci F.M., Toyoda K., Ooboshi H., Rios C.D., Chu Y., Crapo J.D., Davidson B.L., Heistad D.D. (1997). Gene transfer of superoxide dismutase to carotid artery improves relaxation to acetylcholine. *Circulation* 96 (suppl):I-173.
- Lauer U., Burgelt E., Squire Z., Messmer K., Hofschneider P.H., Gregor M., Delius M. (1997). Shock wave permeabilization as a new gene transfer method. *Gene Ther* 4:710-715.
- Lawrie A., Briskin A.F., Francis S.E., Tayler D.I., Chamberlain J., Crossman D.C., Cumberland D.C., Newman C.M. (1999). Ultrasound enhances reporter gene expression after transfection of vascular cells in vitro. *Circulation* 99:2617-2620.
- Ledley F.D. (1995). Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Hum Gene Ther* 6:1129-1144.
- Lefkovits J., Plow E.F., Topol E.J. (1995). Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 332:1553-1559.
- Legendre J.Y., Szoka F.C. (1992). Delivery of plasmid DNA into mammalian cell lines using pH-sensitive liposomes: comparison with cationic liposomes. *Pharm Res* 9:1235-1242.
- Leiden J.M. (2000). Human gene therapy: The good, the bad and the ugly. *Circ Res* 86:923-925.
- Li S., Huang L. (2000). Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gen Ther* 7:31-34.
- Lindner J.R., Ismail S., Spotnitz W.D., Skyba D.M., Jayaweera A.R., Kaul S. (1998). Albumin microbubble persistence during myocardial contrast echocardiography is associated with microvascular endothelial glycocalyx damage. *Circulation* 98:2187-2194.
- Lindner J.R., Coggins M.P., Kaul S., Klibanov A.L., Brandenburger G.H., Ley K. (2000a). Microbubble persistence in the microcirculation during ischemia-reperfusion and inflammation: integrin- and complement-mediated adherence to activated leukocytes. *Circulation* 101:668-675.
- Lindner J.R., Dayton P.A., Coggins M.P., Ley K., Song J., Ferrara K., Kaul S. (2000b). Non-invasive imaging of inflammation by ultrasound detection of phagocytosed microbubbles. *Circulation* 102:531-538.
- Lindner J.R., Song J., Christiansen J., Klibanov A.L., Xu F., Ley K. (2001). Ultrasound assessment of injury and inflammation using microbubbles targeted to P-selectin. *Circulation* 104:2107-2112.
- Liu F., Huang L., Liu D. (1997). Factors controlling the efficiency of cationic lipid-mediated transfection in vivo via intravenous administration. *Gene Ther* 4:517-523.

- Lloyd-Jones D.M., Bloch K.D. (1996). The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med* 47:365–375.
- Losordo D.W., Vale P.R., Symes J.F., Dunnington C., Esakof D.D., Maysky M., Ashare A., Lathi K., Isner J.M. (1998). Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF₁₆₅ as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 98:2800-2804.
- Lund D.D., Faraci F.M., Miller F.J., Heistad D.D. (2000). Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase improves relaxation of carotid arteries from diabetic rabbits. *Circulation* 101:1027-1033.
- Luo D., Saltzman W.M. (2000). Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface. *Nat Biotechnol* 18:893-895.
- Lynch C.M., Hara P.S., Leonard J.C. Williams J.K., Dean R.H., Geary R.L. (1997). Adeno-associated virus vectors for vascular gene delivery. *Circ Res* 80:497-505.
- Mahato R.I., Anwer K., Tagliaferri F., Meaney C., Leonard P., Wadhwa M.S., Logan M., French M., Rolland A. (1998). Biodistribution and gene expression of lipid / plasmid complexes after systemic administration. *Hum Gene Ther* 9:2083-2099.
- Mann J.M., Davies M.J. (1996). Vulnerable plaque: relation of characteristics to degree of stenosis in human coronary arteries. *Circulation* 94:928-931.
- Marsh J., Hall C., Hughes M. et al. (1997). Broad-band through-transmission signals loss measurements of Albunex® suspensions at concentrations approaching in vivo dosis. *J Acoust Soc Am* 101:1155-1161.
- Marshall E. (1999). Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286:2244-2245.
- Matthews K.E., Dev S.B., Toneguzzo F., Keating A. (1995). Electroporation for gene therapy. *Methods Mol Biol* 48:273-280.
- Mattrey R.F. (1994). The potential role of perfluorochemicals (PFC's) in diagnostic imaging. *Art Cells Blood Subs Immob Biotech* 22:295-313.
- McKennan C.J., Camrud A.R., Sangiorgi G., Kwon H.M., Edwards W.D., Holmes D.R.Jr, Schwartz R.S. (1998). Fibrin-film stenting in a porcine coronary injury model: efficacy and safety compared with uncoated stents. *J Am Coll Cardiol* 31:1434-1438.
- Mehdi K., Wilensky R.L., Baek S.H., Trapnell B.C., March K.L. (1996). Efficient adenovirus-mediated perivascular gene transfer and protein delivery by a transvascular injection catheter. *J Am Coll Cardiol* 27(suppl):164A.
- Meltzer R.S., Tickner E.G., Popp R.L. (1980). Why do the lungs clear ultrasound contrast? *J Ultrasound Med Biol* 6:263-269.
- Michel T., Feron O. (1997). Nitric oxide synthases: which, where, how and why? *J Clin Invest* 100:2146–2152.
- Miller D.G., Adam M.A., Miller D. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* 10:4239-4242.
- Miller D.L., Thomas R.M., Frazier M.E. (1991). Ultrasonic cavitation indirectly induces single strand breaks in DNA of viable cells in vitro by the action of residual hydrogen peroxide. *Ultrasound Med Biol* 17:729-735.
- Miller D.L., Thomas R.M., Buschbom R.L. (1995). Comet assay reveals DNA strand breaks induced by ultrasonic cavitation in vitro. *Ultrasound Med Biol* 21:841-848.
- Miller D.L., Williams A.R., Morris J.E., Chrisler W.B. (1998). Sonoporation of erythrocytes by lithotripter shock waves in vitro. *Ultrasonics* 36:947-952.
- Miller D.L., Bao S., Gies R.A. Thrall B.D. (1999). Ultrasonic enhancement of gene transfection in murine melanoma tumors. *Ultrasound Med Biol* 25:1425-1430.
- Miller D.L., Quddus J. (2000). Diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies induces capillary rupture in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10179-10184.

- Miller M.W., Miller D.L., Brayman A.A. (1996). A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasound cavitation from mechanistic perspective. *Ultrasound Med Biol* 22:1131-1154.
- Mohuczy D., Gelband C.H., Phillips M.I. (1999). Antisense inhibition of AT1 receptor in vascular smooth muscle cells using adeno-associated virus-based vector. *Hypertension* 33:354-359.
- Monahan P.E., Samulski R. (2000). AAV vectors: Is clinical success in horizon? *Gene Ther* 7:24-30.
- Mountain A. (2000). Gene Therapy: the first decade. *Trends Biotechnol* 18:119-128.
- Mozes G., Kullo I.J., Mohacsi T.G., Cable D.G., Spector D.J., Crotty T.B., Gloviczki P., Katusic Z.S., O'Brien T. (1998). Ex vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to atherosclerotic rabbit aortic rings improves relaxations to acetylcholine. *Atherosclerosis* 141:265-271.
- Mukherjee D., Wong J., Griffin B., Ellis S.G., Porter T., Sen S., Thomas J.D. (2000). Ten-fold augmentation of endothelial uptake of vascular endothelial growth factor with ultrasound after systemic administration. *J Am Coll Cardiol* 35:1678-1686.
- Nabel E.G., Plautz G., Nabel G.J. (1990). Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into the arterial wall. *Science* 249:1285-1288.
- Nabel E.G. (1995). Gene therapy for cardiovascular disease. *Circulation* 91:541-548.
- Nebergall W.H., Schmidt F.C., Holtzclaw H.F. (1976). College chemistry with quantitative analysis. Lexington (MA):DC Heath, 1976:706.
- Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P.H. (1982). Gene transfer to mouse myeloma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1:841-845.
- Newman K.D., Dunn P.F., Owens J.W., Schulick A.H., Virmani R., Sukhova G., Libby P., Dichek D.A. (1995). Adenovirus-mediated gene transfer into normal rabbit arteries results in prolonged vascular cell activation, inflammation and neointimal hyperplasia. *J Clin Invest* 96:2955-2965.
- Newman C.M., Lawrie A., Briskin A.F., Cumberland D.C. (2001). Ultrasound gene therapy: on the road from concept to reality. *Echocardiography* 18:339-347.
- Niebauer J., Cooke J.P. (1996). Cardiovascular effects of exercise: role of endothelial shear stress. *J Am Coll Cardiol* 28:1652-1660.
- NIH: 452-(2001-01) Phase: IIb-III
Title: A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled, Dose-Response Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Ad5.1FGF-4 in Patients with Stable Angina. Sponsor: Berlex Laboratories.
- NIH (2001). Health Department of the United Kingdom Gene Therapy Advisory Committee. Guidance on making proposals to conduct gene therapy research on human subjects. *Hum Gene Ther* 12:711-720.
- NIH (2002). National Institute of Health Office of Biotechnology Advances (28/06/2002). Clinical trials in human gene transfer: query of clinical trials. *National Institutes of Health web site* (www4.od.nih.gov/oba/rac/trialqueryform.asp).
- Nyborg W.L. (1991). Biological effects of sound and ultrasound. In: Trigg G.L., Encyclopedia of applied physics, New York: VCH Publishers, Inc.:405-420.
- O'Brien E.R., Alpers C.E., Stewart D.K., Ferguson M., Tran N., Gordon D., Benditt E.P., Hinohara T., Simpson J.B., Schwartz S.M. (1993). Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue: implications for antiproliferative therapy. *Circ Res* 73:223-231.
- Oemar B.S., Tschudi M.R., Godoy N., Brovkovich V., Malinski T., Luscher T.F. (1998). Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* 97:2494-2498.

- Ooboshi H., Toyoda K., Faraci F.M., Lang M.G., Heistad D.D. (1998). Improvement of relaxation in an atherosclerotic artery by gene transfer of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 18:1752-1758.
- Optison® Med-Info für Ultraschall-Kontrastmittel (1999). Med-Optison-D-06/99 (Mallinckrodt).
- Orkin S.H., Motulsky A.G. (2002). Report and recommendations of the panel to assess the NIH investment in research on gene therapy. *National Institutes of Health web site* (www.nih.gov/news/panelrep.html).
- Patterson C., Wu Y.X., Lee M.E., Devault J.D., Runge M.S., Haber E. (1997). Nuclear protein interactions with the human KDR/flk-1 promoter in vivo – regulation of Sp1 binding is associated with cell type-specific expression. *J Biol Chem* 272:8410-8416.
- Porter T.R., Xie F., Kilzer K. (1995). Intravenous perfluoropropane-exposed sonicated dextrose albumin produces myocardial ultrasound contrast that correlates with coronary blood flow. *J Am Soc Echocardiogr* 8:710-718.
- Porter T.R., Iversen P.L., Li S., Xie F. (1996). Interaction of diagnostic ultrasound with synthetic oligonucleotide-labeled perfluorocarbon-exposed sonicated dextrose albumin microbubbles. *J Ultrasound Med* 15:577-584.
- Porter T.R., Kricsfeld D., Cheatham S., Li S. (1997). The effect of ultrasound frame rate on perfluorocarbon-exposed sonicated dextrose albumin microbubble size and concentration when insonifying at different flow rates, transducer frequencies and acoustic outputs. *J Am Soc Echocardiogr* 10:593-601.
- Prabhakar P., Thatte H.S., Goetz R.M., Cho M.R., Golan D.E., Michel T. (1998). Receptor-regulated translocation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 273:27383–27388.
- Price R.J., Skyba D.M., Kaul S., Skalak T.C. (1998). Delivery of colloidal particles and red blood cells to tissue through microvessel ruptures created by targeted microbubble destruction with ultrasound. *Circulation* 98:1264-1267.
- Reisner S.A., Shapiro J.R., Schwarz K.Q., Meltzer R.S. (1988). Sonication of echo-contrast agents: a standardized and reproducible method. *J Cardiovasc Ultrasonography* 7:273-276.
- Reisner S.A., Ong L.S., Lichtenberg G.S., Amico A.F., Shapiro J.R., Allen M.N. (1989). Myocardial perfusion imaging by contrast echocardiography with use of intracoronary sonicated albumin in humans. *J Am Coll Cardiol* 14:660-665.
- Rhodes G.H. (1999). Immune pathways used in nucleic acid vaccination. Aus Huang L., Hung M.-C., Wagner E. (Hrsg.). *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. Academic Press, San Diego, London, Boston:379-408.
- Riesz P., Kondo T. (1992). Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Radic Biol Med* 13:247-270.
- Riessen R., Rahimizadeh H., Blessing E., Takeshita S., Barry J.J., Isner J.M. (1993). Arterial gene transfer using pure DNA applied directly to a hydrogel-coated angioplasty balloon. *Hum Gene Ther* 4:749-758.
- Rolland A.P. (1998). From genes to gene medicines: recent advances in nonviral gene delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 15:143-198.
- Rome J.J., Shayani V., Flugelman M.Y., Newman K.D., Farb A., Virmani R., Dichek D.A. (1994). Anatomic barriers influence the distribution of in vivo gene transfer into the arterial wall. Modeling with microscopic tracer particles and verification with a recombinant adenoviral vector. *Arterioscler Thromb* 14:148-161.
- Rosengart T.K., Lee L.Y., Patel S.R. et al. (1999). Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF 121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 100:468–474.

- Sato T.N., Qin Y., Kozak C.A., Audus K.L. (1993). Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9355-9358.
- Sato J., Mohácsi T., Noel A., Jost C., Gloviczki P., Mozes G., Katusic Z.S., O'Brian T. (2000). In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to carotid arteries from hypercholesterolemic rabbits enhances endothelium-dependent relaxations. *Stroke* 31:968-975.
- Scangos G., Ruddle F.H. (1981). Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells - a review. *Gene* 14:1-10.
- Schulik A.H., Newman K.D., Virmani R., Dichek D.A. (1995). In vivo gene transfer into injured carotid arteries: optimization and evaluation of acute toxicity. *Circulation* 91:2407-2414.
- Schulik A.H., Vassalli G., Dunn P.F., Dong G., Rade J.J., Zamerron C., Dichek D.A. (1997). Established immunity precludes adenovirus-mediated gene transfer in rat carotid arteries: potential for immunosuppression and vector engineering to overcome barriers of immunity. *J Clin Invest* 99:209-219.
- Schumacher B., Pecher P., von Specht B. U., Stegmann T. (1998). Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation* 97: 645 - 650.
- Scrope B.A., Newhouse V.L. (1993). Second harmonic ultrasonic blood perfusion measurement. *Ultrasound Med Biol* 19:567.
- Shears L.L., Kibbe M.R., Murdock A.D., Billiar T.R., Lizonova A., Kovesdi I., Watkins S.C., Tzeng E. (1998). Efficient inhibition of intimal hyperplasia by adenovirus-mediated inducible nitric oxide synthase gene transfer to rats and pigs in vivo. *J Am Coll Surg* 187:295-306.
- Shohet R.V., Chen S., Zhou Y.T., Wang Z., Meidell R.S., Unger R.H., Grayburn P.A. (2000). Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium. *Circulation* 101:2554-2556.
- Sipehia R., Martucci G. (1995). High-efficiency transformation of human endothelial cells by ApoE-mediated transfection with plasmid DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 214:206-211.
- Skyba D.M., Price R.J., Linka A.Z., Skalak T.C., Kaul S. (1998). Direct in vivo visualization of intravascular destruction of microbubbles by ultrasound and its local effects on tissue. *Circulation* 98:290-293.
- Somia N.S., Verma I.M. (2000). Gene therapy: trials and tribulations. *Nature Rev/Genetics* 1:91-99.
- Somiari S., Glasspool-Malone J., Drabick J.J., Gilbert R.A., Heller R., Jaroszeski, M.J., Malone R.W. (2000). Theory and in vivo application of electroporative gene delivery. *Mol Ther* 2:178-187.
- Srinivasan S.K., Tewary H.K., Iversen P.L. (1995). Characterization of binding sites, extent of binding, and drug interactions of oligonucleotides with albumin. *Antisense Res Dev* 5:131.
- Stuehr D.J. (1999). Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1411:217-230.
- Tachibana K., Tachibana S. (1995). Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis. *Circulation* 92:1148-1150.
- Tachibana K., Uchida T., Ogawa K., Yamashita N., Tamura K. (1999). Induction of cell-membrane porosity by ultrasound. *Lancet* 353:1409.
- Tahlil O., Bami M., Feldman L.J., Branellec D., Steg P.G. (1997). The Dispatch catheter as a delivery tool for arterial gene transfer. *Cardiovasc Res* 33:181-187.
- Taniyama Y., Tachibana K., Hiraoka K., Namba T., Yamasaki K., Hashiya N., Aoki M., Ogihara T., Yasufumi K., Morishita R. (2002a). Local delivery of plamid DNA into carotid artery using ultrasound. *Circulation* 105:1233-1239.

- Taniyama Y., Tachibana K., Hiraoka K., Aoki M., Yamamoto S., Matsumoto K., Nakamura T., Ogihara T., Kaneda Y., Morishita R. (2002b). Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther* 9:372-80.
- Tata D.B., Dunn F. (1992). Interaction of ultrasound and model membrane systems: analyses and predictions. *J Phys Chem* 96:3548-3555.
- Tata D.B., Dunn F., Tindall D.J. (1997). Selective clinical ultrasound signals mediate differential gene transfer and expression in two human prostate cancer cell lines: LnCap and PC-3. *Biochem Biophys Res Commun* 234:64-67.
- Tsutsui M., Chen A.F., O'Brien T., Crotty T.B., Katusic Z.S. (1998). Adventitial expression of recombinant eNOS gene restores NO production in arteries without endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1231-1241.
- Umans J.G., Levi R. (1995). Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure. *Annu Rev Physiol* 57:771-790.
- Unger E.C., McCreery T.P., Sweitzer R.H. (1997). Ultrasound enhances gene expression of liposomal transfection. *Invest Radiol* 32:723-727.
- Unger E.C., McCreery T.P., Sweitzer R.H., Shen D., Wu G. (1998). In vitro studies of a new thrombus-specific ultrasound contrast agent. *Am J Cardiol* 81(suppl):58G-61G.
- Unger E.C., Hersh E., Vannan M., McCreery T.P. (2001). Gene delivery using ultrasound contrast agents. *Echocardiography* 18:355-361.
- Vaheri A., Pagano J.S. (1965). Infectious poliovirus RNA: A sensitive method of assay. *Science* 175:434.
- Vale P.R., Losordo D.W., Milliken C.E., Maysky M., Esakof D.D., Symes J.F., Isner J.M. (2000). Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF (165) gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation* 102:965-974.
- Vale P.R., Losordo D.W., Milliken C.E., McDonald M.C., Gravelin L.M., Curry C.M., Esakof D.D., Maysky M., Symes J.F., Isner J.M. (2001). Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 103:2138-2143.
- Vandenberg B.F., Melton H.E. (1994). Acoustic liability of albumin microspheres. *J Am Soc Echocardiogr* 7:582-589.
- Vannan M., McCreery T.P., Li P., Han Z., Unger E.C., Kuersten B., Nabel E.G., Rajagopalan S. (2002). Ultrasound mediated transfection of canine myocardium by intravenous administration of cationic microbubble-linked plasmid DNA. *J Am Soc Echocardiogr* 15:214-218.
- Vicat J.M., Boisseau S., Jourdes P., Laine M., Wion D., Bouali-Benazzouz R., Benabid A.L., Berger F. (2000). Muscle transfection by electroporation with high-voltage and short-pulse currents provides high-level and long lasting gene expression. *Hum Gene Ther* 11:909-916.
- Villanueva F.S., Jankowski R.J., Klibanov S., Pina M.L., Alber S.M., Watkins S.C., Brandenburger G.H., Wagner W.R. (1998). Microbubbles targeted to intercellular adhesion molecule-1 bind to activated coronary endothelial cells. *Circulation* 98:1-5.
- Wagner E., Cotten M., Foisner R., Birnstiel M.L. (1991). Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4255-4259.
- Watson J.D., Crick F.H.C. (1953). Genetical implications of the structure of desoxyribonucleic acid. *Nature* 171:964-969.

- Wei K., Skyba D.M., Firschke C., Jayaweera A.R., Lindner J.R., Kaul S. (1997). Interactions between microbubbles and ultrasound: in vitro and in vivo observations. *J Am Coll Cardiol* 29:1081-1088.
- Weiler-Guettler H., Aird W.C., Husain M., Rayburn H., Rosenberg R.D. (1996). Targeting of transgene expression to the vascular endothelium of mice by homologous recombination at the thrombomodulin locus. *Circ Res* 78:180-187.
- Wever R.M., Luscher T.F., Cosentino F., Rabelink T.J. (1998). Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 97:108-112.
- Weyman A.E. (1994). Principles and practice of echocardiography. Malvern: Lea & Febiger 1994:302-326.
- White C.R., Brock T.A., Chang L.-Y., Crapo J., Briscoe P., Ku D., Bradley W.A., Gianturco S.H., Gore J., Freeman B.A., Tarpey M.M. (1994). Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1044-1048.
- Williams S.B., Cusco J.A., Roddy M.A., Johnstone M.T., Creager M.A. (1996). Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 27:567-574.
- Wu G.Y., Wu C.H. (1987). Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* 262:4429-4432.
- Wu G.Y., Grove R.I. (1998a). Preclinical trials using hepatic gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 30:199-204.
- Wu Y., Unger E.C., McCreery T.P., Sweitzer R.H., Shen D., Wu G., Vielhauer M.D. (1998b). Binding and lysing of blood clots using MRX-408. *Invest Radiol* 33:880-885.
- Wyber J.A., Andrews J., D'Emanuele A. (1997). The use of sonication for the efficient delivery of plasmid DNA into cells. *Pharm Res* 14:750-756.
- Xia Y., Roman L.J., Masters B.S., Zweier J.L. (1998). Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *J Biol Chem* 273:22635-22639.
- Yan Z., Hansson G.K. (1998). Overexpression of inducible nitric oxide synthase by neointimal smooth muscle cells. *Circ Res* 82:21-29.
- Yla-Herttuala S., Martin J.F. (2000). Cardiovascular gene therapy. *Lancet* 355:213-222.
- Zabner J., Fasbender A.J., Moninger T., Poellinger K.A., Welsh M.J. (1995). Cellular and molecular barriers to gene transfer by cationic lipid. *J Biol Chem* 270:18997-19007.
- Zanetti M., Sato J., Katusic Z.S., O'Brien T. (1999). Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase and superoxide dismutase improves vascular reactivity of aortas from diabetic rabbits. *Circulation* 100(suppl I):I-624.
- Zeiher A.M., Drexler H., Saurbier B., Just H. (1993). Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans: effect of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia and hypertension. *J Clin Invest* 92:652-662.
- Zeiher A.M., Schaeffinger V., Minners J. (1995). Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation* 92:1094-1100.
- Zeiher A.M. (1996). Endothelial vasodilator dysfunction: pathogenetic link to myocardial ischemia or epiphenomenon? *Lancet* 348(suppl):S10-S12.
- Zhang G., Budker V., Williams P., Subbotin V., Wolff J.A. (2001). Efficient expression of naked plasmid DNA delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 12:427-438.
- Zolotukhin S., Byrne B.J., Mason E., Zolotukhin I., Potter M., Chesnut K., Summerford C., Samulski R.J., Muzyczka N. (1999). Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther* 6:973-985.
- Zou S.-M., Erbacher P., Remy J.S., Behr J.P. (2000). Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse. *J Gene Med* 2:128-134.

7. Publikationen

Originalarbeiten

- Teupe C. *), Richter S. *), Fisslthaler B., Randriamboavonjy V.F., Ihling C., Fleming I., Busse R., Zeiher A.M., Dimmeler S. (2002). Vascular gene transfer of phosphomimetic endothelial nitric oxide synthase (S1177D) using ultrasound-enhanced destruction of plasmid-loaded microbubbles improves vasoreactivity. *Circulation* 105:1104-1109.
*) contributed equally

Publizierte Abstracts

- Teupe C., Richter S., Fisslthaler B., Busse R., Dimmeler S., Zeiher A.M. (2000). Efficient local gene delivery by ultrasound-induced destruction of DNA-loaded albumin microbubbles. *Circulation* 102 (Suppl):II-148.
- Richter S., Teupe C., Fisslthaler B., Randriamboavonjy V.F., Ihling C., Busse R., Zeiher A.M., Dimmeler S. (2001). Lokale Genapplikation mittels Ultraschall-induzierter Freisetzung von DNA aus DNA-beladenen Albumin-Mikrosphären. *ZKardiol* 90 (Suppl 2):II-283.
- Teupe C., Richter S., Fisslthaler B., Fleming I., Randriamboavonjy V.F., Busse R., Zeiher A.M. (2001). Improvement of vasoreactivity by local vascular gene transfer of phosphomimetic eNOS (S1177D) using ultrasound-enhanced destruction of plasmid-loaded microspheres. *Circulation* 104 (Suppl):II-115.
- Teupe C., Richter S., Fisslthaler B., Randriamboavonjy V.F., Fleming I., Busse R., Zeiher A.M., Dimmeler S. (2002). Efficient endothelial gene transfer with preserved vascular integrity by ultrasound-enhanced destruction of plasmid-loaded albumin microbubbles. *Eur Heart J* 23:381.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die an der Entstehung und Vollendung dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Die vorliegende Promotionsarbeit entstand in der Zeit von Januar 2000 bis Dezember 2001 an der Universitätsklinik der Johann Wolfgang Goethe-Universität im Zentrum der Inneren Medizin in der Abteilung Molekulare Kardiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas M. Zeiher. Ich danke Herrn Prof. Zeiher für die Aufnahme als Doktorand in sein Forschungsteam, in welchem er mir unter hervorragenden Arbeitsbedingungen ermöglicht hat, basierend auf seinem konstruktiven Konzept selbständig mit integriertem Spielraum für die Einbringung eigener Ideen an dem Bubble-Projekt zu arbeiten.

Frau Prof. Dr. Dimmeler gebührt besonders großen Dank für die exzellente Betreuung meiner Arbeit, mit stets kreativen Ideen und konstruktiver Kritik hat Frau Prof. Dimmeler ausschlaggebend an dieser Arbeit mitgewirkt. Zudem möchte ich hervorheben, daß sie sich trotz ihrer Position als Leiterin der Molekularen Kardiologie immer Zeit für Diskussionen und Problemlösungen genommen hat und die initial mitunter nötige Geduld für den „Nichtschwimmer“ aufbrachte.

Ein ganz dickes Dankeschön geht an PD Dr. Claudius Teupe für das tolle Teamwork. Claudius als der Ultraschallexperte in der Abteilung für klinische Kardiologie hat mit seinem komplexen Wissen über den Kontrastultraschall und seinen zündenden Ideen zur UIMD-Transfektion maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Nicht nur die vielen und manchmal hart umkämpften Stunden im Labor, sondern auch die gemeinsame Zeit außerhalb der Labortätigkeiten haben wir gemeinsam mit viel Humor und Spaß gut gemeistert. Claudius, vielen Dank!

Mein besonderer Dank gilt dem Team um Prof. Dr. Rudi Busse aus der Abteilung für Kardiovaskuläre Physiologie für die kooperative, interdisziplinäre Zusammenarbeit, allen voran Dr. Beate Fisslthaler und Dr. Ingrid Fleming. Sei es die Organisation der Koronararterien, deren Präparation, die kompletten physiologischen Versuchsreihen zur Vasomotorik oder konstruktive Diskussionen, ohne Euer Engagement wäre diese Arbeit sicher nicht möglich gewesen. Super vielen Dank! Zudem war es mir immer eine Freude, mit meiner weißen Box einen kleinen Ausflug in die Katakomben der Physiologie zu machen, wo ich sehr nett aufgenommen wurde. Die Zusammenarbeit mit Euch

hat mich nicht nur forschungstechnisch weitergebracht, sondern hat mir auch viel Spaß gemacht.

Aus dem Labor möchte ich allen danken, die mich in irgendeiner nur erdenklichen Art unterstützt haben.

Hervorhebend möchte ich Meike Stahmer erwähnen, die sich vor allem in den schwierigeren Anfangszeiten als Nichtschwimmer meiner angenommen und mich durch die endlosen Gewässer der Labormethodiken gelotst hat. Durch ihre stets freundliche und offene Art sowie ihre Hilfsbereitschaft hat sie mir das Laborleben sehr erleichtert. Als guter Freund hatte sie immer auch ein Ohr für wichtige Dinge, die neben der Forschungstätigkeit das Leben eines Studenten beeinflussen.

Danken möchte ich weiterhin meinem Schachfreund und Kardiologen Ernst Geiss, der mich in meinen studentischen Jahren in die Geheimnisse der klinischen Kardiologie eingeweiht hat. Unter seinen Fittichen habe ich vor allem in der klinischen Ultraschalldiagnostik viel gelernt. Außerhalb der Klinik war und ist Ernst immer für eine Runde Blitzschach bei einem kühlen Bierchen zu haben. Klasse!

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Eltern und meine Schwester Manon, die mich auf besondere Weise vor allem privat unterstützt haben.

9. Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, daß ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Ultraschall-induzierte Destruktion von
Plasmid-DNA-beladenen Microbubble-Vektoren**

Ein neues non-virales Vektorsystem für den lokalen Gentransfer

im Zentrum der Inneren Medizin, Medizinische Klinik IV, unter Betreuung und Anleitung von Herrn Prof. Dr. Andreas M. Zeiher mit Unterstützung durch Frau Prof. Dr. Stefanie Dimmeler ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Circulation 2002; 105:1104-1109.

Frankfurt am Main, 15.03.2004

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Richter, Sergio-Luis
Geburtsdatum	19.05.1976
Geburtsort	Fulda
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulausbildung

08/1982 - 07/1986	Grundschule
08/1986 - 06/1995	Gymnasium Marianum Fulda
23.06.1995	Abitur

Zivildienst

08/1995 - 08/1996	Betreuung körperlich und geistig behinderter Kinder in der Blindeninstitutsstiftung Würzburg
-------------------	--

Studium

10/1996 – 05/2003	Medizinstudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
10/1999	Beginn des Romanistikstudiums an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
08/2001 – 10/2001	Aufenthalt in Südamerika und Famulatur in Lima Universidad Peruana Cayetano Heredia- Instituto Tropical Alexander v. Humboldt
04/2002 – 03/2003	Praktisches Jahr in den Städtischen Kliniken Frankfurt-Höchst Wahlfach: Neurologie
15.05.2003	3. Staatsexamen mit Abschluß des Medizinstudiums Gesamtnote: sehr gut

Beruf

seit 10/2003	Arzt im Praktikum in der Uniklinik Frankfurt am Main, Medizinische Klinik IV - Kardiologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. A. M. Zeiher
--------------	---

Schachsport

1994-1995	Hessischer Jugendmeister U20
1995-1996	Hessischer Blitzschachmeister U20